



UBA

Universidad de Buenos Aires

TESIS DE MAESTRIA EN BIOLOGIA MOLECULAR MEDICA

“SISTEMA KALIKREINA KININA: INHIBICIÓN DEL CANAL DE POTASIO DE LA MEDULA EXTERNA RENAL (ROMK) Y GONADECTOMÍA”

Autor: Bioq. Dario Guevara

Director: Dra. Elvira Emilia Arrizurieta

Director Adjunto: Dr. Pablo Javier Azurmendi

**Laboratorio de Nefrología Experimental y Bioquímica Molecular,
Instituto de Investigaciones Médicas “Alfredo Lanari”**

Buenos Aires, Julio de 2016

Contenido

1. INTRODUCCION	2
1.1 Anatomía y Fisiología renal.....	2
1.2 Formación de la orina	8
1.3 Funciones homeostáticas del riñón	9
1.4 Transporte renal de solutos	11
1.4.1 Transporte de potasio.....	12
1.5 Sistema Kalikreina Kinina	14
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES	16
2.1 Objetivos específicos:	16
3. MATERIALES Y METODOS	17
3.1 Modelo experimental	17
3.2 Diseño experimental	18
3.2.1 Gonadectomía	18
3.2.2 Administración de Glibenclamida	19
3.3 Métodos.....	19
3.3.1 Medición de electrolitos en orina y aldosterona	20
3.3.2 Medición de filtrado glomerular y determinación de inulina	20
3.3.3 Cálculo de la fracción excretada (Fe)	21
3.3.4 Extracción de ARN - Retrotranscripción a DNAc - PCR cuantitativa en tiempo real ...	21
3.3.4 Actividad de kalikreina urinaria.....	26
3.4 Análisis estadístico.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Presión arterial y filtrado glomerular (FG)	28
4.2 Balance hidrosalino.....	30
4.2.1 Excreción y fracción excretada de potasio.....	30
4.2.2 Excreción y fracción excretada de sodio	31
4.2.3 Relación Na^+/K^+ urinaria.....	33
5. ALDOSTERONA	34
6. ESTUDIO DE LOS TRANSCRIPTOS Kcnj1 y Atp1a1 EN MEDULA RENAL.....	34
6.1 Efecto de la glibenclamida sobre la expresión génica de Kcnj1 en médula renal	35
6.2 Efecto de la glibenclamida sobre la expresión génica de Atp1a1 en médula renal	35
7. ESTUDIO DE LOS TRANSCRIPTOS Kcnj1 y Atp1a1 EN CORTEZA RENAL	36
7.1 Efecto de la glibenclamida en la expresión génica de Kcnj1 y Atp1a1	36
8. EFECTO DE LA GONADECTOMIA EN LA EXPRESION GENICA DE Kcnj1 y Atp1a1 ...	37
9. EFECTOS DEL TRATAMIENTO SOBRE EL SISTEMA KALIKREINA KININA.....	37
10. ANALISIS MULTIVARIADO DE LA VARIANZA (MANOVA)	39
11. DISCUSION	40
12. BIBLIOGRAFÍA	45
12. ANEXO.....	49

1. INTRODUCCION

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores causales de cardiopatías y accidentes cerebrovasculares. A pesar del incremento de la detección precoz de la enfermedad y del amplio espectro de medicación existente para su control, continúa siendo uno de los mayores determinantes de la morbimortalidad cardiovascular, afectando a más del 25% de la población. Los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en esta enfermedad involucran al riñón, sobre todo en individuos expuestos a una alta ingesta crónica de sodio o inadecuada de potasio, con secreción inapropiada de renina, deficiencia de sustancias vasodilatadoras ó alteraciones del transporte celular de iones. (1)

1.1 Anatomía y Fisiología renal

Los riñones se disponen en la pared posterior del abdomen, a lo largo de los músculos psoas, fuera de la cavidad peritoneal, y sobre cada riñón hay una glándula suprarrenal (Fig.1). Cada riñón de un ser humano adulto normal pesa unos 150 g, y tienen entre 10 a 12 cm de largo, 5 a 6 cm de ancho y de 3 a 4 cm de espesor. La cara medial de cada riñón presenta una hendidura, llamada hilio, por la que ingresan la arteria y vena renales, los vasos linfáticos, las fibras nerviosas y el uréter, que transporta la orina final desde el riñón hasta la vejiga, donde se almacena hasta el momento de la micción. El riñón está rodeado de una capsula fibrosa y tensa que protege sus delicadas estructuras internas.

Un corte transversal del riñón muestra las 2 regiones principales que lo componen: la corteza en la parte externa y la médula en la interna. La medula se divide en 8 -10 masas de tejido en forma de cono llamadas pirámides renales o pirámides de Malpighi. La base de cada pirámide se origina en el límite entre corteza y médula y termina en la papila, que se proyecta hacia la pelvis renal, una extensión de la porción superior del uréter en forma de abanico (Fig. 2). (2)

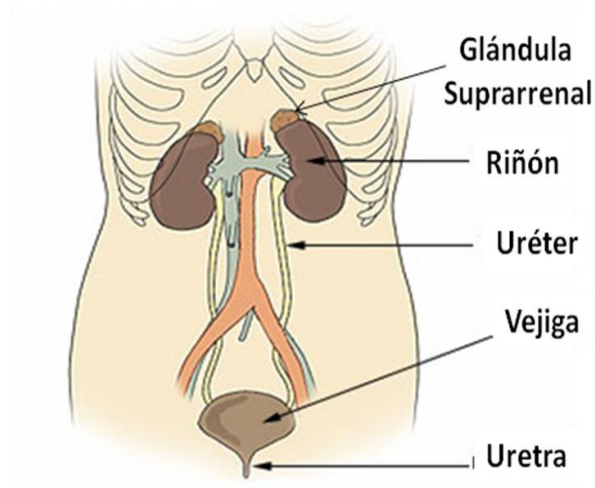


Figura 1: Componentes del sistema urinario.

El borde externo de la pelvis se divide en sáculos abiertos, llamados cálices mayores, que se extienden hacia abajo y se dividen en los cálices menores, los cuales recogen la orina formada por los túbulos a los están conectados. Las paredes de los cálices, la pelvis y el uréter contienen fibras contráctiles que transportan la orina hacia la vejiga. (2)

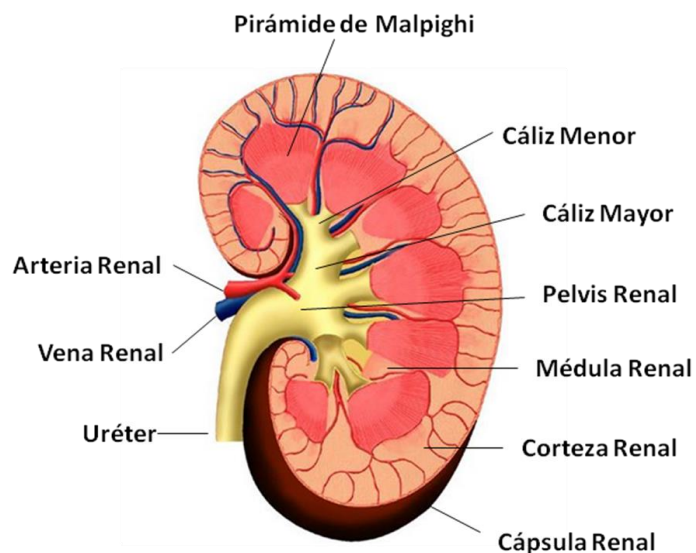


Figura 2: Diagrama de las principales estructuras de un corte transversal de riñón

La unidad funcional es el nefrón (Fig. 3), y cada riñón está compuesto por 800.000 a 1.000.000 de ellos, capaces de filtrar aproximadamente 150 litros diarios de fluidos desde el torrente sanguíneo. Cada nefrón está constituido por un glomérulo y un túbulo. El glomérulo está constituido por una red de capilares que se ramifican y se anastomosan, revestidos por la capsula de Bowman. Su función es filtrar la sangre que ingresa a través de la arteriola aferente y egresa por la eferente. El túbulo es una estructura epitelial altamente diferenciada que se inicia en el polo urinario de la cápsula de Bowman y finaliza en la pelvis renal. A medida que el ultrafiltrado glomerular pasa por ellos, fluye de forma secuencial a través de sus diferentes partes (túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal, túbulo colector y, finalmente, el conducto colector) hasta formar la orina. (2)

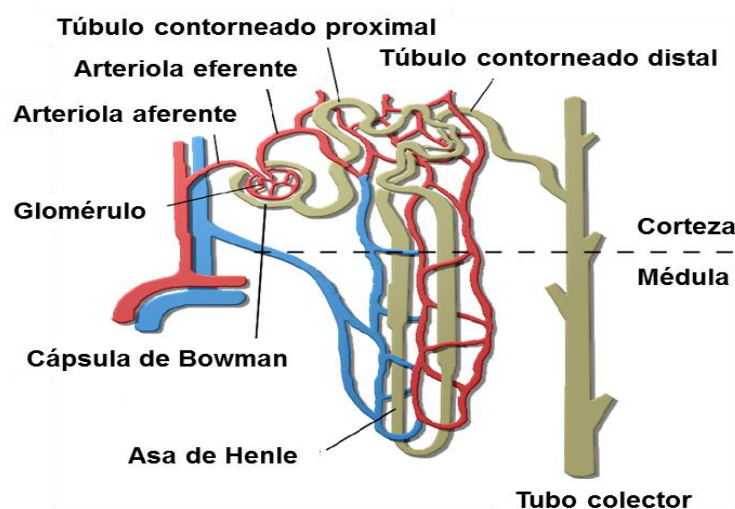


Figura 3: Esquema estructural del nefrón

Cada sección del túbulo posee una función determinada dependiendo de la complejidad celular por la que está compuesto y que se describe a continuación:

Túbulo proximal

El inicio del túbulo renal comprende al túbulo proximal, cuya primera porción es contorneada, y finaliza en una sección recta y se subdivide en tres segmentos: S1, S2 y

S3. El segmento S1 comienza en el polo urinario de la capsula de Bowman e incluye la primera porción contorneada del túbulo. El segmento S2 comprende la segunda porción contorneada y el inicio de la parte recta del túbulo. El segmento S3 incluye la parte distal recta, extendiéndose hasta la médula.

Tanto la membrana basal como apical de las células del túbulo proximal están muy desarrolladas. La membrana apical posee microvellosidades, denominadas “ribete en cepillo”, que proporcionan una superficie luminal muy extensa, indispensable para la principal función del túbulo proximal: la reabsorción. Esta consiste en absorber los nutrientes filtrados de vuelta a la sangre. La complejidad celular disminuye desde el S1 al S3, coherente con una disminución gradual de la tasa de reabsorción a lo largo del túbulo. Las células van perdiendo microvellosidades, decrece la complejidad de las interdigitaciones laterales, disminuye el área de la membrana basolateral y el número de mitocondrias. (2)

Asa de Henle

Este segmento del túbulo tiene forma de U y conecta al túbulo proximal con el distal. El asa de Henle consta de tres segmentos con funciones diferentes: el segmento descendente fino, el segmento ascendente fino y el segmento ascendente grueso.

Según la longitud del asa se pueden distinguir dos tipos de nefrones que difieren en su capacidad de concentrar la orina:

- Corticales, caracterizado por una asa de Henle corta y se extienden hasta la médula externa.
- Yuxtamedulares, presentan una larga asa de Henle que se extienden hasta la médula interna. Esta morfología le confiere mayor capacidad de concentración urinaria que los corticales.

Los segmentos descendente fino y ascendente fino, tienen membranas epiteliales finas sin bordes en cepillo, pocas mitocondrias y niveles mínimos de actividad metabólica.

El segmento descendente fino, es muy permeable al agua y moderadamente a los solutos, ya que su función principal es permitir la reabsorción por difusión simple de hasta el 20 % del agua filtrada.

Las células de la rama ascendente fina son menos complejas todavía que las del segmento S3 del túbulo proximal, poseen muy pocas mitocondrias y poco desarrollo de membrana, y a diferencia del segmento descendente es casi impermeable al agua.

La rama ascendente gruesa posee un gran número de mitocondrias, y una elevada actividad metabólica necesaria para la absorción activa de sodio (Na^+), potasio (K^+) y cloro (Cl^-).

Un componente importante de la reabsorción de solutos en la rama ascendente gruesa, es la bomba ATPasa sodio/potasio en las membranas basolaterales de la célula epitelial, que junto al cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ reabsorbe el sodio al interior de la célula. (2)

Túbulo distal

El túbulo distal es el corto segmento que conecta la rama ascendente gruesa de Henle con el túbulo colector cortical.

En la pared de la primera porción del túbulo distal se encuentra una placa de células epiteliales especializadas, conocida como mácula densa, y que junto a las células yuxtaglomerulares en las paredes de las arteriolas aferentes y eferentes conforman el complejo yuxtaglomerular (CYG). (2)

Este grupo de células tiene un estrecho contacto con las arteriolas aferente y eferente del glomérulo, que perciben cambios en el volumen que llega al túbulo distal por medio de señales no completamente dilucidados que modifican la filtración glomerular. Estudios experimentales hacen pensar que la reducción del filtrado glomerular (FG) disminuye la velocidad del flujo que llega al asa de Henle, lo que aumenta la reabsorción de iones sodio y cloro en la rama ascendente del asa de Henle, disminuyendo la

concentración de cloruro de sodio en las células de la mácula densa. Esta reducción de la concentración de cloruro de sodio desencadena una señal que parte desde la mácula densa y tiene dos efectos para normalizar el FG: 1) reduce la resistencia al flujo sanguíneo en las arteriolas aferentes, lo que eleva la presión hidrostática glomerular y 2) aumenta la liberación de renina en las células yuxtaglomerulares, que son los principales reservorios de la enzima.

Las células yuxtaglomerulares son células musculares lisas modificadas. La localización del CYG es crítica: permite sensar la presión de la sangre que llega al glomérulo como la composición final de la orina, antes de llegar al túbulo colector. En función de las variaciones que se detectan en el CYG secreta renina, que origina la formación de angiotensina I, que se convierte enzimáticamente en angiotensina II, y que finalmente contrae las arteriolas eferentes, con lo que aumenta la presión hidrostática glomerular y ayuda a normalizar el filtrado glomerular. (3)

Túbulo colector

El túbulo colector puede dividirse en túbulo colector cortical y túbulo colector medular. Están compuestos por células principales y por células intercaladas. Las células principales reabsorben Na^+ y Cl^- y secretan K^+ . Una tercera parte del túbulo colector está formado por células intercaladas, las cuales secretan protones (H^+), las células intercaladas A, o bicarbonato (HCO_3^-), las células intercaladas B, y reabsorben potasio (K^+).

A lo largo de este recorrido por los diferentes segmentos de túbulo, algunas sustancias se reabsorben selectivamente en los túbulos volviendo a la sangre, mientras que otras se secretan a la luz tubular. Finalmente, la orina ya formada representa la suma de los tres procesos que se producen en el riñón: **filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción tubular** (Fig. 4).

1.2 Formación de la orina

La formación de la orina es el resultado de la filtración glomerular, la reabsorción tubular y la secreción tubular (Fig.4).

La cantidad excretada de cierta sustancia representa la suma de tres procesos renales:

$$\text{Excreción: Filtración} - \text{Reabsorción} + \text{Secreción}$$

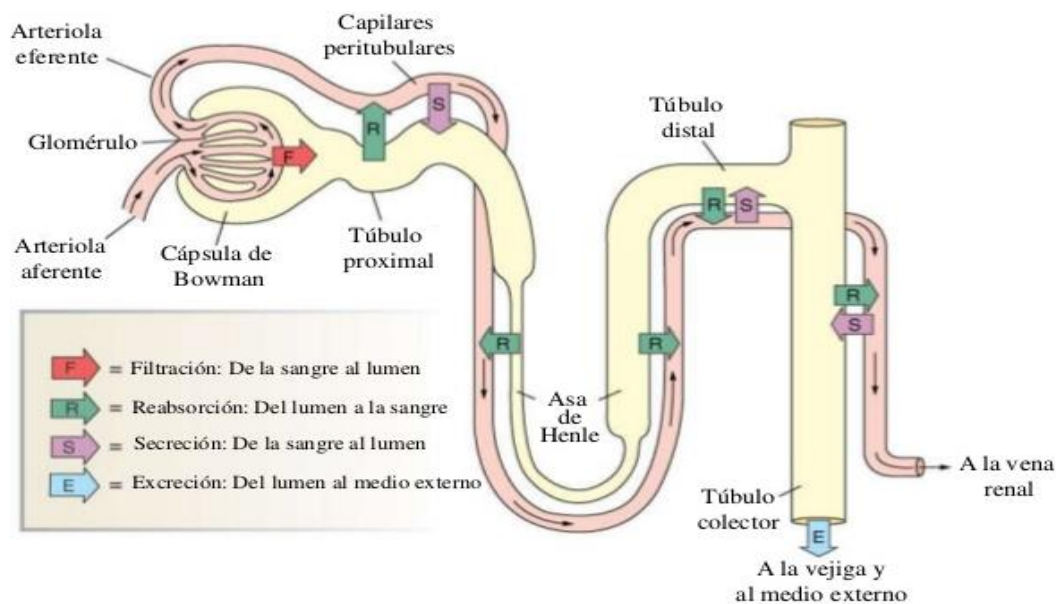


Figura 4: Formación de la orina. Procesos de filtración, reabsorción, secreción y excreción.

La formación de la orina comienza con la filtración de una gran cantidad de líquido desde los capilares glomerulares a la cápsula de Bowman. La mayoría de las sustancias del plasma, salvo las proteínas del tamaño de la albúmina o mayor, se filtran libremente. Cuando el filtrado sale de la cápsula de Bowman y pasa por los túbulos, su composición se va modificando debido a la reabsorción de agua y distintos solutos y a la secreción de otras sustancias al interior de los túbulos. La reabsorción tubular es mayor que la secreción tubular dentro del proceso de formación de la orina. La mayoría de las sustancias de la sangre que tienen que ser depuradas se reabsorben poco y por lo tanto se excretan en grandes cantidades. Ejemplos son la urea, la creatinina y el ácido úrico. Algunas sustancias extrañas, como los fármacos, también se reabsorben poco pero además se secretan desde la sangre, de modo que sus tasas de excreción son elevadas.

Los electrolitos sodio, cloruro y bicarbonato, se reabsorben en gran proporción, por lo que sólo aparecen en la orina en pequeñas cantidades. Sustancias nutritivas como la glucosa y los aminoácidos se reabsorben completamente en los túbulos, por lo que no aparecen en la orina. Estos procesos permiten que el riñón cumpla con numerosas funciones homeostáticas como excreción de productos de desecho; regulación de los equilibrios hidroelectrolítico y acido-base; regulación de la osmolaridad plasmática; secreción, metabolismo y excreción de hormonas y gluconeogenia. Estas funciones mantienen el medio interno y la presión arterial estables, condición indispensable para que las células de todo el organismo desempeñen sus diversas actividades. (4)

1.3 Funciones homeostáticas del riñón

Entre las funciones renales podemos describir los siguientes puntos (2):

1. Excreción de productos metabólicos de desecho: Los riñones son el principal medio que dispone el organismo para eliminar productos de desecho del metabolismo que ya no son necesarios, como la urea, la creatinina, el ácido úrico, productos de degradación de la hemoglobina y metabolitos de algunas hormonas. Los riñones eliminan también toxinas y sustancias extrañas que se han producido o ingerido.
2. Regulación del equilibrio hídrico y electrolítico: Para mantener la homeostasis, la excreción de agua y electrolitos debe equipararse exactamente al ingreso de los mismos. Los riñones tienen una gran capacidad para modificar la excreción de sodio en respuesta a las variaciones en el ingreso de este catión. Estudios experimentales han comprobado que en muchas personas el ingreso de sodio puede aumentar diez veces más de lo normal o verse disminuido a una décima parte sin dar lugar más que a cambios relativamente pequeños del volumen del líquido extracelular. Esto también es cierto para el agua y para la mayoría de los electrolitos (cloro, potasio, magnesio, fosfatos y demás iones).

3. Regulación de la presión arterial: Los riñones desempeñan un papel dominante en la regulación a largo plazo de la presión arterial mediante la excreción variable de sodio y agua. Contribuyen también a la regulación de la presión arterial a corto plazo mediante la secreción de sustancias vasoactivas.
4. Regulación del equilibrio ácido-base: Los riñones participan en la regulación del equilibrio ácido-base mediante la excreción de ácidos y regulando las reservas de las sustancias buffer en los líquidos corporales. Los riñones son el único medio para eliminar del cuerpo ciertas clases de ácidos generados en el metabolismo de las proteínas, como el ácido sulfúrico y el fosfórico.
5. Regulación de la producción de eritrocitos: Los riñones secretan eritropoyetina, una hormona que estimula la producción de glóbulos rojos. Un estímulo importante para la secreción de eritropoyetina es la hipoxia. En pacientes con disminución severa de la función renal, aparece una anemia intensa como consecuencia de la falta de producción de eritropoyetina.
6. Regulación de la formación de 1,25-dihidroxitamina D: Los riñones producen la forma activa de la vitamina D, esencial para el depósito de calcio en el hueso y la absorción de calcio en el tubo digestivo.
7. Síntesis de glucosa: En situaciones de ayuno prolongado los riñones sintetizan glucosa a partir de aminoácidos u otros precursores (gluconeogénesis). Esta capacidad de aporte de glucosa en condiciones de ayuno prolongado es comparable a la que posee el hígado.

Como contraparte, en enfermedades renales crónicas o en la insuficiencia renal aguda, estas funciones homeostáticas desaparecen y rápidamente se producen grandes alteraciones en los volúmenes y composición de los líquidos corporales. Cuando la función renal cesa, se produce una retención en el organismo de potasio, ácidos, líquidos

y otras sustancias que, en pocos días, es suficiente para producir la muerte de no mediar una terapia sustitutiva de la función renal. (2)

1.4 Transporte renal de solutos

La filtración glomerular carece relativamente de selectividad y prácticamente todos los solutos del plasma se filtran salvo las proteínas del plasma o las sustancias unidas a ellas; mientras que la reabsorción y secreción tubular son muy selectivas. Algunas sustancias, como la glucosa y los aminoácidos, se reabsorben en su mayoría en los túbulos, por lo que su excreción urinaria es prácticamente nula. Muchos de los iones del plasma, como el sodio, el cloro y el bicarbonato, también se reabsorben, pero su reabsorción y excreción urinarias varían dependiendo de las necesidades del organismo, mientras que los productos de desecho, como la urea y la creatinina son excretados en cantidades relativamente grandes. Por tanto, al controlar la intensidad de reabsorción de diversas sustancias, los riñones regulan la excreción de los solutos de forma independiente entre sí, una facultad que es esencial para el control preciso de la composición de los líquidos corporales. Para que una sustancia se reabsorba desde la luz tubular, primero debe ser transportada: 1) a través de las membranas del epitelio tubular hacia el intersticio renal y luego 2) a través de la membrana capilar peritubular hacia la sangre. La reabsorción de agua y solutos a través del epitelio tubular hacia el espacio intersticial se efectúa mediante un transporte activo y/o pasivo. El transporte activo puede mover un soluto en contra de un gradiente electroquímico y para ello precisa energía, por lo cual está acoplado directamente a una fuente de energía, como la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP). Los transportadores activos primarios renales son la ATPasa Na^+/K^+ , la ATPasa H^+ , la ATPasa H^+/K^+ y la ATPasa Ca^{++} . (2)

La bomba ATPasa Na^+/K^+ es esencial para todas las células de mamíferos y está constituida por 4 subunidades, dos subunidades alfa y dos subunidades beta que se

unen formando un tetrámero en la membrana. La subunidad alfa consta de 8 segmentos, en ella se unen tanto el ATP y los tres iones sodio en el citoplasma, como los dos iones potasio en el lado extracelular. Por su parte la unidad beta está compuesta por una estructura única helicoidal, cuya función es mantener a las subunidades alfa en contacto y dentro de la membrana. (5)

Además, el riñón también responde a estímulos hormonales, algunos de ellos relacionados con la regulación del transporte de solutos, ejemplo de ello es la aldosterona. La aldosterona, que secretan las células de la capa glomerulosa de la corteza suprarrenal, es un importante regulador positivo de la reabsorción de Na^+ y la secreción de K^+ en los túbulos renales. Estimula la bomba ATPasa Na^+/K^+ en el lado basolateral de la membrana de las células principales del túbulo colector cortical, y también aumenta la permeabilidad al sodio del lado luminal de la membrana. (6)

1.4.1 Transporte de potasio

Diversos transportadores a lo largo del nefrón manejan los intercambios de K^+ , dentro de los cuales se encuentra el canal rectificador de potasio de la médula externa renal (ROMK). El ROMK es un complejo multiprotéico ATP-sensible que juega un rol importante en la excreción y absorción renal de K^+ , principalmente en el asa ascendente gruesa de Henle y túbulo colector cortical (TCC).

Este canal de potasio puede ser inhibido por las sulfonilureas (SU). Estos son fármacos hipoglucemiantes derivados de un núcleo sulfonilureico, con 2 radicales terminales a ambos extremos (R1, R2), de cuya sustitución se derivan los diferentes compuestos, entre ellos la glibenclamida (Gli). Las SU actúan mediante su unión a un receptor específico (SUR), situado en la membrana de la célula, que junto con una unidad interna «rectificadora» (Kir 4.1), forman parte de los denominados canales de K^+ ATP dependientes. (7) Estos canales epiteliales de K^+ también son necesarios para el

transporte epitelial de cloruro de sodio en el asa ascendente de Henle mediante la salida de potasio hacia la luz tubular generando el reciclado de potasio necesario para establecer el gradiente electroquímico que permite la reabsorción de cloruro de sodio a través del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ apical. Dicha reabsorción es impulsada por la ATPasa Na^+/K^+ en membrana basolateral, que media la salida de sodio hacia el espacio intersticial y la entrada de K^+ a la célula, despolarizando la membrana y propiciando la salida de potasio - vía ROMK - hacia la luz tubular (Fig. 5). (8) Alteraciones en este mecanismo están presentes en el síndrome de Bartter, un trastorno tubular que presenta hipopotasemia, alcalosis metabólica con una tensión arterial normal o baja y altos niveles de renina y aldosterona. Específicamente, la variante tipo II de este síndrome, se origina por mutaciones no funcionantes del ROMK. (9)

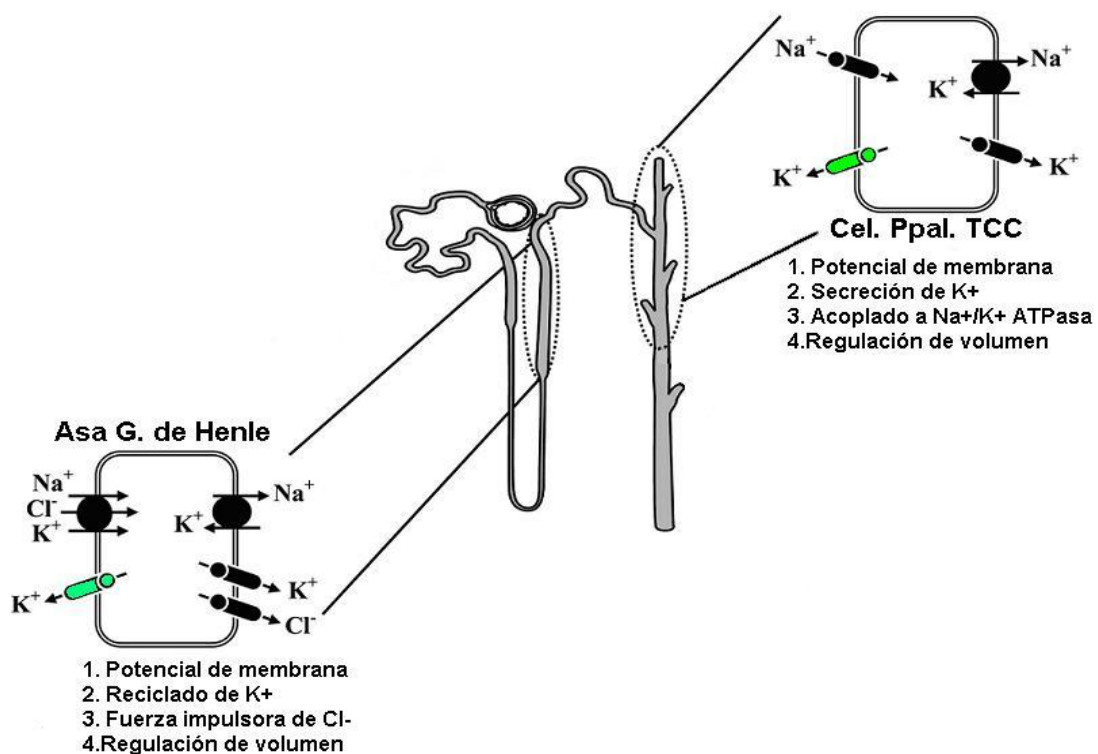


Figura 5: Canales involucrados en la reabsorción de sodio en el asa gruesa de Henle y túbulo colector cortical (TCC). En verde se señala el canal rectificador de K^+ de médula externa renal (ROMK).

A su vez en el nefrón distal se reabsorben entre el 5% y el 8% del sodio filtrado, según las necesidades impuestas por la ingesta, para mantener el balance adecuado.

Allí también se regula la excreción de potasio. Este segmento es sensible a la acción de la aldosterona, comprende el túbulo contorneado distal, el túbulo conector cortical y el túbulo colector cortical y en su ámbito se ubican sistemas involucrados en el transporte de los iones mencionados (ATPasa Na^+/K^+ y ROMK), el canal electrogénico epitelial de sodio (ENaC) y transportador electroneutro de sodio (NCC). En la porción distal del nefrón cortical actúa otro sistema vasoactivo: el sistema kalikreina kinina (SKK). (10)

1.5 Sistema Kalikreina Kinina

El SKK representa una cascada metabólica que lleva a la liberación de sustancias vasoactivas, denominadas kininas. La principal kinina es la bradikina (BK), un nonapeptido: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg. También están la kalidina (KL) y la T-kinina (TK). Las kalikreinas son serinoproteasas que clivan al kininogeno. Existen dos precursores del kininógeno, el de alto peso molecular y de bajo peso molecular, que se generan por *splicing* alternativo del mismo gen. La kalikreína plasmática cliva en dos pasos al primero generando bradikina, mientras que la kalikreína tisular, como la presente en riñón, cliva al segundo de ellos originando kalidina. (11) Las kininas están involucradas en la activación de células endoteliales, vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular y producción de óxido nítrico (NO), por lo que modulan la presión sanguínea, la función renal y cardíaca. (12) La unión de las kininas a sus receptores - B1 ó B2 - genera vasodilatación en el musculo liso por medio de la acción de las prostaglandinas y NO, causando una caída de la presión arterial, como lo demuestra la administración exógena aguda de kininas, con un aumento en la diuresis y natriuresis. (13) Este efecto hipotensor puede ser bloqueado tanto por un antagonista del receptor B2 como por un antagonista de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). (14)

Resultados previos de nuestro laboratorio y de otros, demuestran una relación estrecha entre el K^+ y el SKK. La ingesta prolongada de cloruro de potasio en ratas

espontáneamente hipertensas (SHR) induce la activación del SKK incrementando el consumo de agua y excreción urinaria de kininas, reduciendo la presión arterial. (15) La suplementación con K^+ ejerce un efecto hipotensor con un aumento concomitante del SKK, y dicha estimulación está mediada por la aldosterona dado que, al bloquear su receptor con espironolactona, se anula dicho efecto. (16)

El SKK presenta un dimorfismo sexual en cuanto a los valores basales de kalikreina en tejido renal y kalikreina urinaria (KU), siendo mayores en hembras que en machos. (17,18) Esta hipótesis también es apoyada por experimentos en los que la ovariectomía estimula el SKK mediante la síntesis y almacenamiento de kalikreina en tejido renal, disminuyendo la presión arterial. Dicho fenómeno es abolido al bloquear el SKK con aprotinina ó HOE-140. (17)

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES

El propósito de este trabajo es contribuir al mejor conocimiento de la hipertensión arterial mediante la determinación de los factores comprometidos en su fisiopatología, con el fin de proveer estrategias terapéuticas para, al menos, disminuir el riesgo de las complicaciones que actualmente ocasiona.

Es por ello que estudiaremos el manejo renal de K^+ por el canal ROMK y la bomba ATPasa Na^+/K^+ , los cambios electrolíticos y hemodinámicos al inhibir el ROMK mediante el tratamiento con glibenclamida en un modelo experimental de hipertensión arterial. Conociendo que el SKK renal posee actividad vasodilatadora y que la liberación de su marcador (kalikreina) se encuentra ligado a la excreción de K^+ , es de suponer que la inhibición del ROMK modificará dicho sistema y, por ende, la presión arterial. Asimismo, nuestra línea de trabajo se asienta en el hallazgo, en el que las hormonas sexuales son modificadoras del comportamiento tanto de la presión arterial como del SKK, lo que supondría que la respuesta del punto anterior tendrá como uno de los factores determinantes la ablación de las gónadas.

2.1 Objetivos específicos:

1. Estudiar los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) de la cadena alfa-1 de ATPasa Na^+/K^+ (Atp1a1) y del ROMK-1 (Kcnj1) en corteza y médula renal de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con y sin tratamiento con glibenclamida.
2. Evaluar la influencia de las hormonas sexuales sobre el punto 1, mediante gonadectomía, contrastando los resultados con los de sus respectivos controles.
3. Analizar la relación de los puntos anteriores con la actividad del SKK, a través de la actividad de KU y niveles de ARNm del gen Kik1.
4. Evaluar los parámetros bioquímicos moleculares anteriormente citados con los parámetros clínicos y perfil renal de los diferentes grupos experimentales.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Modelo experimental

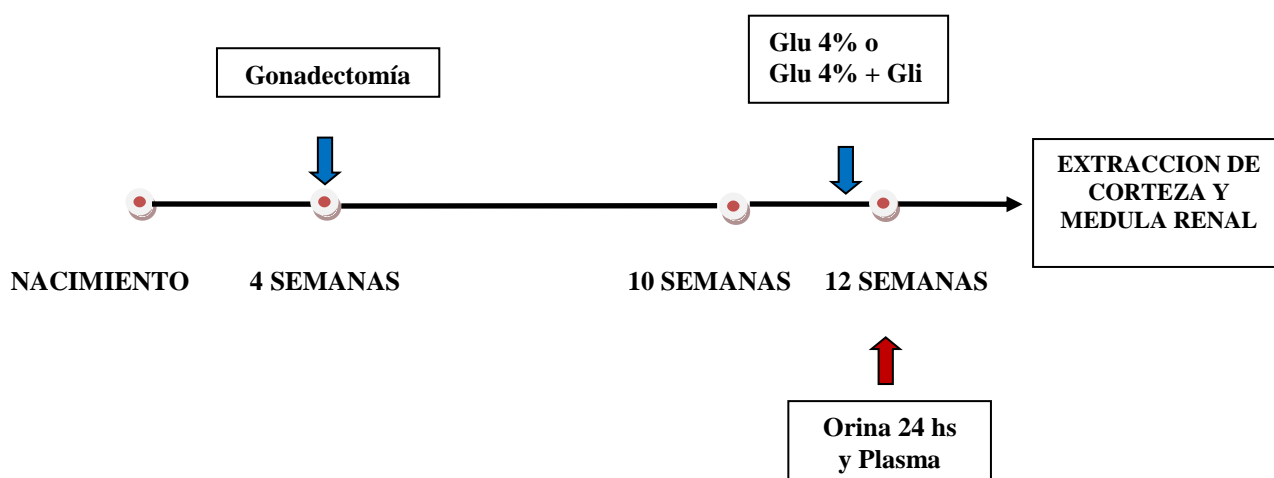
Se estudiaron 40 ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Fig. 6), de ambos sexos a las 12 semanas de vida. Este modelo animal fue obtenido por Okamoto y colegas, que descubrieron un macho Wistar Kyoto (WKY) con presión arterial (PA) marcadamente elevada y hembras con PA levemente elevada. La cepa SHR, es extensamente utilizada como modelo animal en el estudio de la hipertensión esencial humana. Son ratas albinas que luego de la tercera semana de edad presentan aumento en su presión arterial sistólica y engrosamiento de la pared de los vasos sanguíneos. La hipertensión se presenta de manera espontánea a partir de la quinta semana, a la semana 10 su presión arterial sistólica está por encima de 150 mmHg, alcanzando valores máximos (>180 mmHg) en la semana 12 de vida. Existe un dimorfismo sexual ya que los machos presentan mayores niveles respecto de las hembras. (19, 20)



Figura 6: Ratas SHR.

Los animales se mantuvieron a libre acceso a comida y bebida; en jaulas a 24°C y 12:12 horas ciclo luz/oscuridad en el bioterio del Instituto de Investigaciones Médicas “Alfredo. Lanari”.

El esquema del desarrollo experimental y toma de muestras fue el siguiente:



3.2 Diseño experimental

3.2.1 Gonadectomía

Se realizó la gonadectomía (Gx) al destete (4° semana) en la mitad de los animales, previa anestesia leve con ketamina/xilasina; por personal especializado y bajo las normas de procedimientos establecidas por el CICUAL IDIM-UE (Comisión Institucional del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio).

Se higienizó el área con un agente antimicrobiano y se realizó una incisión bilateral en las hembras o una incisión en el escroto en los machos. Se removieron las gónadas y luego se suturó.

Se trabajó con 4 (cuatro) grupos de ratas identificados de la siguiente forma:

GRUPOS	SIMBOLOGIA
Hembra	H
Hembra Ovariectomizada	oVx
Macho	M
Macho Orquidectomizado	oRx

3.2.2 Administración de Glibenclamida

La glibenclamida (Gli) es un inhibidor de los canales de potasio sensibles a ATP; que actúa disminuyendo la permeabilidad de la membrana al K^+ , usualmente utilizado como hipoglucemiante oral, por tal motivo se utilizó glucosa 4% como vehículo de administración del tratamiento.

En los 3 días previos al estudio se les administró una solución glucosada al 4% (Glu. 4%) con ó sin Glibenclamida (20 mg/kg peso corporal) por vía oral. (21) De esta manera se conforma el esquema de trabajo con cuatro grupos control (Glu. 4%) y cuatro grupos tratados (Glu. 4% + Gli.).

3.3 Métodos

Mediante el uso de jaulas metabólicas se obtuvieron muestras de orina de 24 hs, donde se midió la diuresis, Na^+ , K^+ y actividad de kalikreina urinaria (KU).

Se realizó el *clearance* de inulina y se extrajeron muestras de sangre para el dosaje de aldosterona.

Las ratas fueron pesadas y anestesiadas con pentobarbital (5 mg/100 g de peso; intraperitoneal Dr. Gray, Buenos Aires, Argentina) y se canularon con tubos de polietileno la tráquea y la carótida. La presión arterial media se midió mediante un catéter ubicado en la carótida conectado a un transductor. Se infundió inulina vía endovenosa para la determinación de filtrado glomerular.

Se extirparon los riñones, separando la corteza de la médula renal en bandeja metálica sobre hielo y en presencia del inhibidor de RNAasa DEPC (dietilpirocarbonato 0,1%). Las muestras fueron homogeneizadas y almacenadas a $-70^{\circ}C$ hasta su procesamiento.

3.3.1 Medición de electrolitos en orina y aldosterona

La concentración de Na^+ y K^+ se midieron por fotometría de llama; la cual se fundamenta en medir la intensidad de energía emitida al regresar a su estado inicial después de haber sido excitado por la activación de los átomos que provoca la llama. Los niveles de Na^+ y K^+ urinarios fueron expresados en mEq/día corregidos por 100 gramos de peso corporal (PC). La osmolalidad se midió por descenso crioscópico y se expresó en mosm/KgH₂O.

Los niveles de aldosterona en plasma fueron determinados mediante radioinmunoensayo y expresados en pg/ml.

3.3.2 Medición de filtrado glomerular y determinación de inulina

El filtrado glomerular (FG) se determinó mediante el *clearance* de inulina (Inutest, Linz, Austria). La inulina es un polifruktosano constituido por largas cadenas de fructosa unidas por enlaces glicosídicos β 1-2. Es un carbohidrato de reserva que se encuentra en los tubérculos de dalia y en la raíz de alcaucil. El *clearance* de inulina se utiliza para la determinación del filtrado glomerular y provee una estimación muy aceptada de la función renal. (22) Durante el procedimiento se administró cantidad suficiente de inulina para asegurar una concentración plasmática de 0.2 mg/ml, administrando una inyección de carga seguida de una infusión de sostén a razón de 0.025ml/min por medio de una bomba Harvard n°944. Se tomaron muestras blanco de sangre y orina, y después de 45 min de equilibrio se recolectaron 3 muestras de orina con intervalos de 30 min. y tres muestras de plasma que se extrajeron en la mitad de la colección de los períodos de orina.

Para la determinación de inulina en orina y sangre se utilizó el método de la Antrona. La antrona (10-ceto-9, 10-dihidroantraceno) forma un compuesto amarillento en ácido sulfúrico que hidroliza enlaces glicosídicos para dar monosacáridos que luego

pueden reaccionar con la antrona dando un complejo de color verdoso, y su absorbancia es directamente proporcional a la concentración de inulina. (23)

3.3.3 Cálculo de la fracción excretada (Fe)

El cálculo de la excreción fraccional, también denominada excreción fraccionada (Fe), es la cantidad de un ion determinado que sale del organismo a través de la orina, comparada con la cantidad filtrada y reabsorbida por el riñón. Por este motivo se utiliza un compuesto que se filtre de forma libre y no se reabsorba, para realizar el cálculo comparativo, en nuestro caso la inulina. Ejemplo: Fracción excrecional de Na⁺ (FeNa⁺)

$$\text{FeNa}^+ = \frac{\text{U Na}^+ / \text{P Na}^+}{\text{U inulina} / \text{P inulina}}$$

U Na⁺ = Concentración urinaria de sodio; P Na⁺ = Concentración plasmática de sodio; U inulina = Concentración urinaria de inulina; P inulina = Concentración sérica de inulina

3.3.4 Extracción de ARN - Retrotranscripción a DNAc - PCR cuantitativa en tiempo real

Se realizó la extracción del ARN total, retrotranscripción a ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) y posterior cuantificación de ARNm de Kcjn1; Atp1a1 y B-actina por PCR en tiempo real (LightCycler 2.0 – ROCHE) con SYBR Green I.

Extracción de ARN

El ARN total se extrajo desde los homogenatos de corteza y médula renal, utilizando el kit SV/Total RNA Isolation System (Promega). Se utilizó tiocianato de guanidinio (GTC) y el B-mercaptoetanol para inactivar las ribonucleasas presentes. El GTC junto con el dodecilsulfato sódico (SDS) rompen los complejos nucleoprotéicos, permitiendo que el ARN quede soluble y libre de proteínas. La dilución de alta

concentración de GTC genera la precipitación de proteínas quedando el ARN en solución, para ser precipitado posteriormente con etanol. Luego los ácidos nucleicos se unen por afinidad a una membrana de sílica y el ADN contaminante se elimina mediante el agregado de endonucleasa (DNAsa I). (24)

Las muestras fueron almacenadas a -70°C y se consideró una buena muestra la determinación de la relación de densidad óptica medida a 260 y 280 nm mayor a 1,8. La concentración de ARN se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 nm y considerando que una unidad de densidad óptica representa 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA total.

Retrotranscripción de ARNm

La retrotranscripción del ARNm a ADNc se realizó con un kit comercial Ready-To-Go You-Prime First Strand Beads (GE Healthcare).

Se partió de 3,3 μg de RNA total, los que se llevaron a un volumen de 30 μl con agua tratada con dietilpirocarbonato al 0,1 %. Se calentó a 65°C durante 10 minutos. Luego, la solución de RNA se colocó en hielo durante 2 minutos.

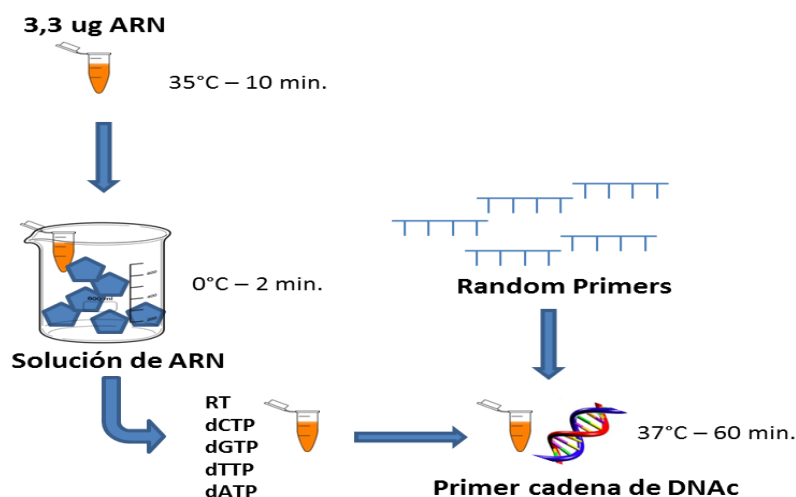


Figura 7: Retrotranscripción. Se muestra el protocolo utilizado para la obtención de la primera cadena de DNAc.

Se transfirió la solución de RNA al tubo que contenía los reactivos, que en este caso se encuentran en los “beads”. Dichos “beads” contienen buffer, dATP, dCTP, dGTP,

dTTP y transcriptasa reversa murina. Se agregaron *random primers* (Amersham Biosciences) y se incubó a 37°C por una hora. Se obtuvo así la primera cadena de DNAC (Fig. 7).

PCR cuantitativa en tiempo real

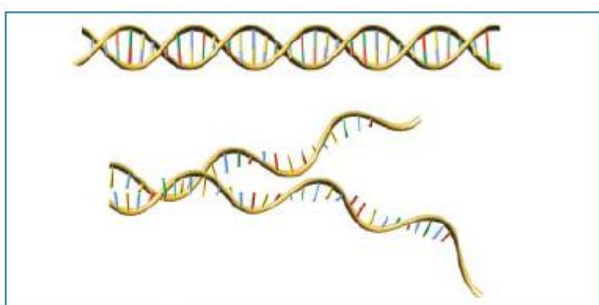
La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es una reacción en cadena de una enzima (*Taq*. Polimerasa), en donde el producto de la reacción es cuantificado en simultáneo a la amplificación, a través de la medición de un fluorocromo. La qPCR se realizó utilizando **LightCycler® 2.0 de Roche Applied Science**. Todo este proceso ocurre en un mismo capilar de reacción en donde las etapas son las siguientes (Fig. 8):

Desnaturalización. En el comienzo, las cadenas de ADN son separadas a una temperatura de 95 °C. Al final de esta etapa tendremos el ADN en cadenas simples que servirán como molde para el siguiente paso.

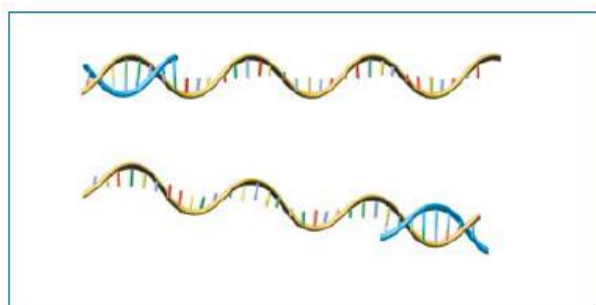
Annealing. Los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridizan con su secuencia complementaria. La temperatura de hibridación oscila entre 50-60 °C.

Extensión. La *Taq*. polimerasa actúa sobre el complejo templado-*primers*, agregando dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas ocurre en dirección 5' → 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C.

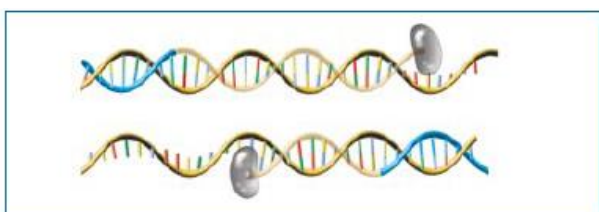
Cuantificación. Al final del ciclo, el fluorocromo utilizado se intercala con los amplicones formados generando una fluorescencia que puede ser medible. (25)



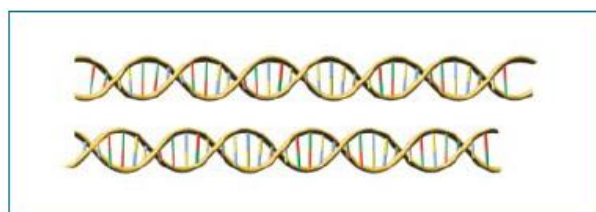
Paso 1: Desnaturalización



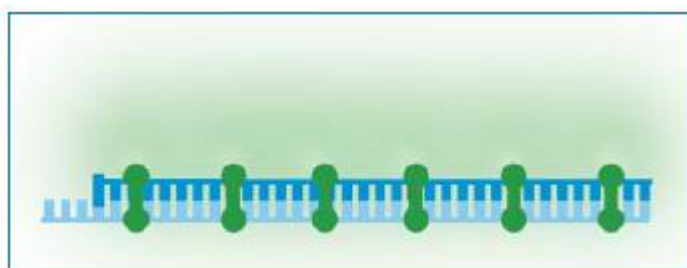
Paso 2: *Annealing*



Paso 3: Extensión mediada por Taq. Polimerasa



Paso 4: Fin del primer ciclo y producto final.



Paso 5: Unión del SYBR Green a la doble cadena de ADN.

Figura 8: PCR cuantitativa en tiempo real.

Durante la amplificación, el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente alcance el nivel umbral, se conoce como *Threshold cycle* (CT) y es el parámetro en el cual se fundamenta la cuantificación. A mayor Ct, menor será la cantidad de templado inicial.

La figura 9 A muestra las curvas típicas de amplificación, donde se grafica en el eje de las ordenadas el aumento de fluorescencia producido durante el transcurso de la reacción y cada ciclo de la PCR en el eje de las abscisas.

En nuestro trabajo, el fluorocromo utilizado para cuantificar el producto de PCR fue el SYBR Green I, compuesto orgánico de fórmula química $C_{32}H_{34}N_4S$ que forma parte de

las cianinas asimétricas y tiene la capacidad de intercalarse a la doble hebra de ADN emitiendo hasta mil veces más fluorescencia que cuando se encuentra en solución (absorbe luz de 480 nm de longitud de onda y emite a 520 nm).

Su principal desventaja es la inespecificidad, ya que se une independientemente de la secuencia del ADN, pudiendo generar falsos positivos al detectar ADN espurios, por ejemplo, los dímeros de primers de la reacción.

Una forma de asegurar la especificidad, es analizando las curvas de disociación o de *melting*, que caracteriza los productos amplificados a través de sus *melting point* específicos, que dependen de la longitud y composición nucleotídica. (Fig.9 B).

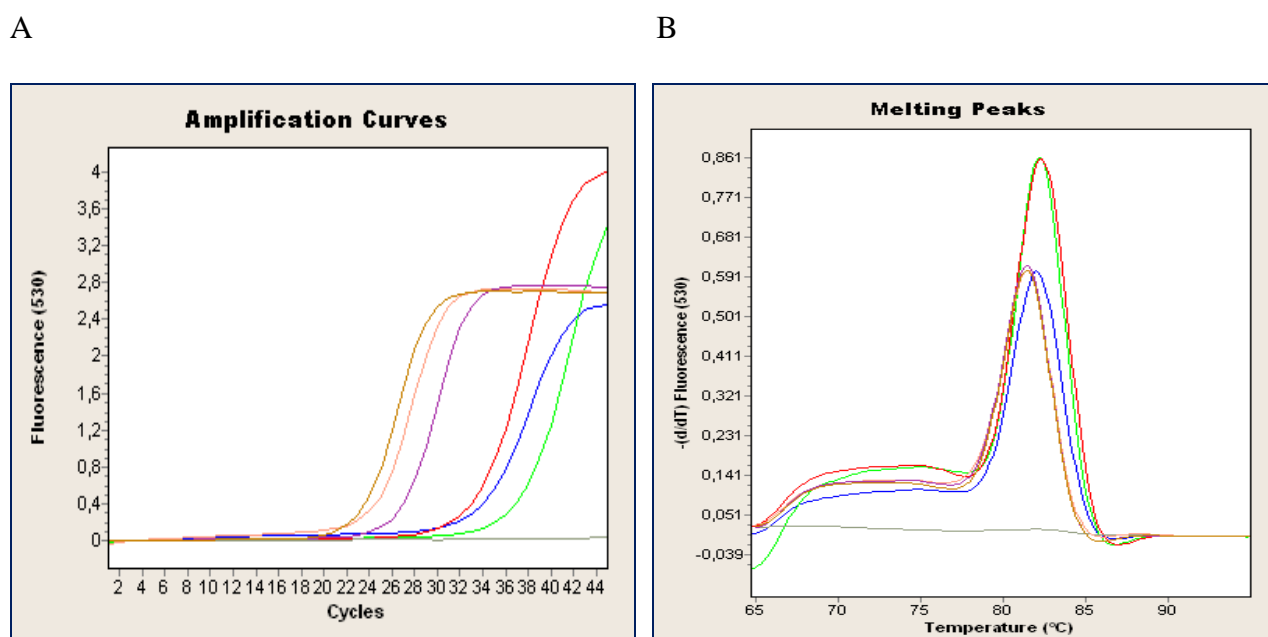


Figura 9: Curvas de qPCR. A Curvas de amplificación en escala lineal; **B** Curvas de *melting*

Para confirmar el tamaño de los productos amplificados se realizaron corridas electroforéticas de los productos obtenidos y un marcador de peso molecular (M) en gel de agarosa al 4 % (Fig.10).

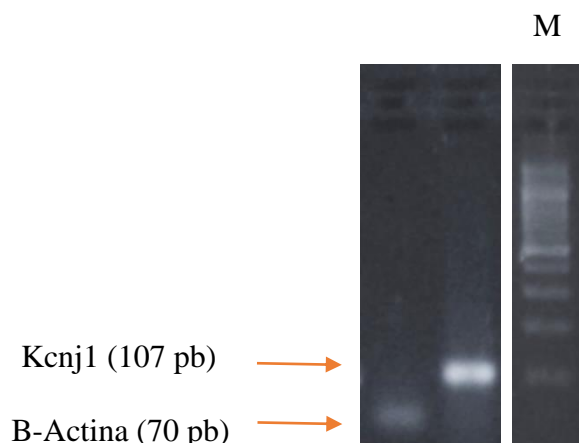


Figura 10: Corrida electroforética de los transcritos en gel de agarosa al 4%.

Para analizar los cambios en la expresión de los genes estudiados en respuesta a los tratamientos, se realizó una cuantificación relativa, utilizando la beta actina como gen de referencia.

Los resultados se expresaron como la tasa de cambio (TC) de ARNm de los genes blanco con respecto al de B-Actina, calculando la eficiencia de cada uno de los *target* y utilizando la ecuación matemática de Pfaffl para cuantificación relativa en qPCR. (26)

Los cebadores (*primers*) se diseñaron conforme análisis bioinformático mediante la utilización de BLAST, Primer3, University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser para los genes de Kcnj1 [NM_017023.1], Klk1 [NM_031523.1], Atp1a1 [NM_012504.1] y BACT [NM_001101.3]. (En anexo se detallan los *primers* utilizados y tamaño de los productos amplificados)

3.3.4 Actividad de kalikreina urinaria

La determinación de kalikreina (KU) se realizó en orina de 24 horas previamente diluída 1:250 con agua destilada. La actividad de kalikreina se midió en el sobrenadante, usando el método amidolítico utilizando como

sustrato el péptido cromogénico H-D-Val-Leu-Arg-p-nitroalínida (S2266; Kabi Diagnostica, Suecia) a pH 8,2. La p-nitroanilida liberada se midió espectrofotométricamente a 405 nm y la actividad de kalikreína se expresó en unidades katal (kat). Un katal es la cantidad de enzima que desdobla 1 mol de sustrato por segundo de incubación a 37°C (Fig. 11). (27)

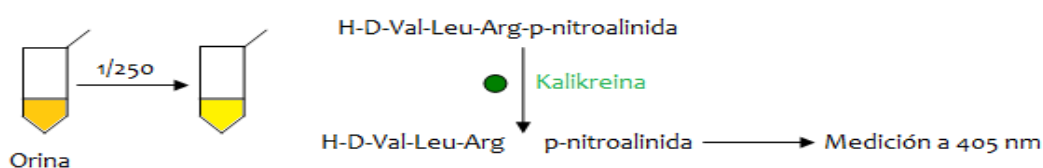


Figura 11: Medición de actividad de kalikreína en orina.

3.4 Análisis estadístico

Las variables se expresan como media \pm error estándar de la media. Las variables continuas se analizaron por test de Student y el efecto de cada tratamiento se estudió mediante un ANOVA multifactorial.

Las relaciones entre dos variables continuas se evaluaron por regresión lineal simple. Se utilizó el software SPSS 10.0 y se consideró un $p < 0,05$ como significativa

4. RESULTADOS

En el grupo control (Glu. 4 %), el peso corporal (PC) de los machos (M) fue mayor que el de las hembras (H) de la misma edad. La Gx. generó una disminución del peso corporal en machos (257 ± 19 g vs 207 ± 13 g; $p < 0,05$), mientras que en las hembras se observó un aumento (158 ± 8 g vs 194 ± 10 g; $p < 0,05$).

La remoción de las gónadas disminuyó el peso de los riñones de los machos ($2,01 \pm 0,01$ g vs $1,64 \pm 0,23$ g; $p < 0,05$), observando un aumento en el peso renal (PR) de las hembras ($1,24 \pm 0,03$ g vs $1,43 \pm 0,17$ g; $p < 0,05$). Al evaluar la relación entre el peso renal y corporal, no se observaron diferencias significativas asociadas al tratamiento con glibenclamida y/o la gonadectomía (Fig. 12).

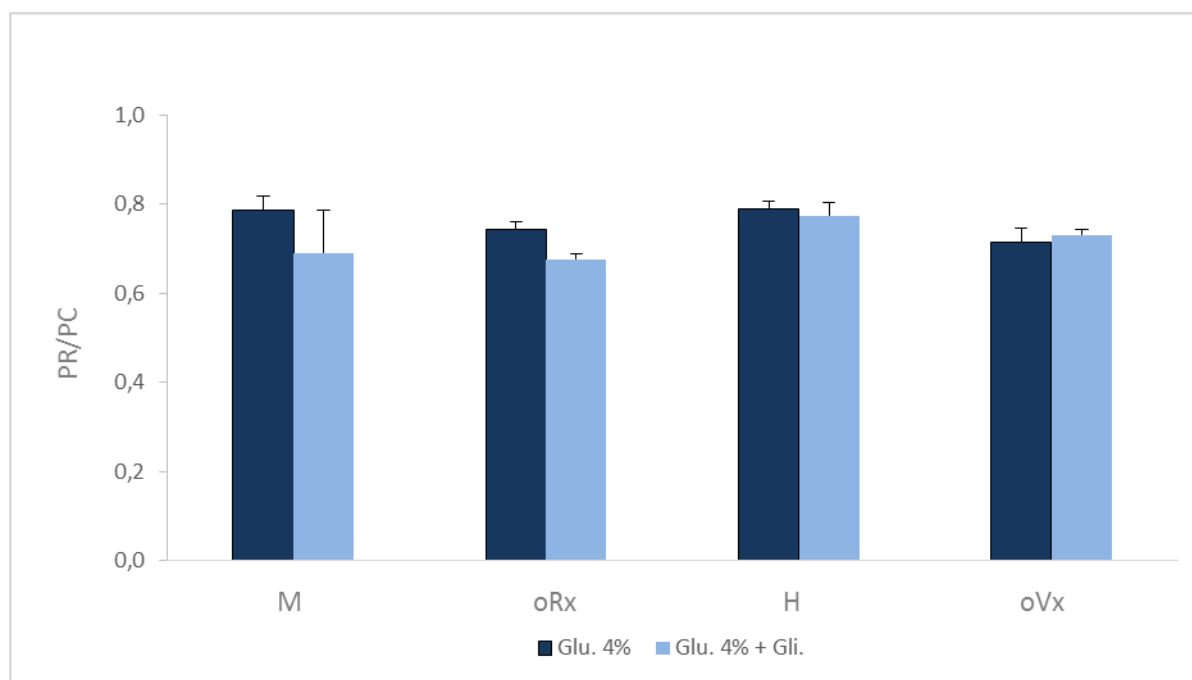


Figura 12: Relación Peso renal vs. Peso corporal de los distintos grupos. No se observan diferencias significativas.

4.1 Presión arterial y filtrado glomerular (FG)

Si analizamos los datos de presión arterial media (PAM) de los distintos grupos en estudio, podemos observar que no existen diferencias significativas entre los animales

tratados y su respectivo control (Glu. 4%). Esto demostraría que los tratamientos aplicados sobre los distintos grupos en estudio no modificaron la PAM (Fig. 13).

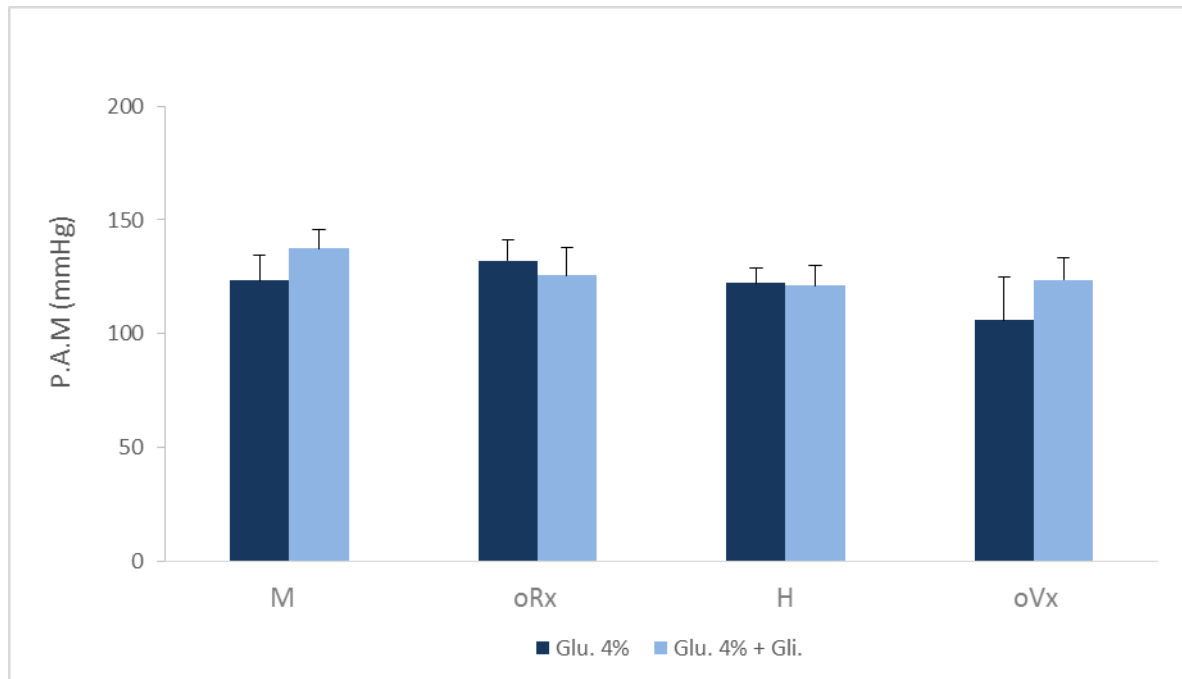


Figura 13: Presión arterial de los distintos grupos y sus respectivos controles. No se observan diferencias significativas.

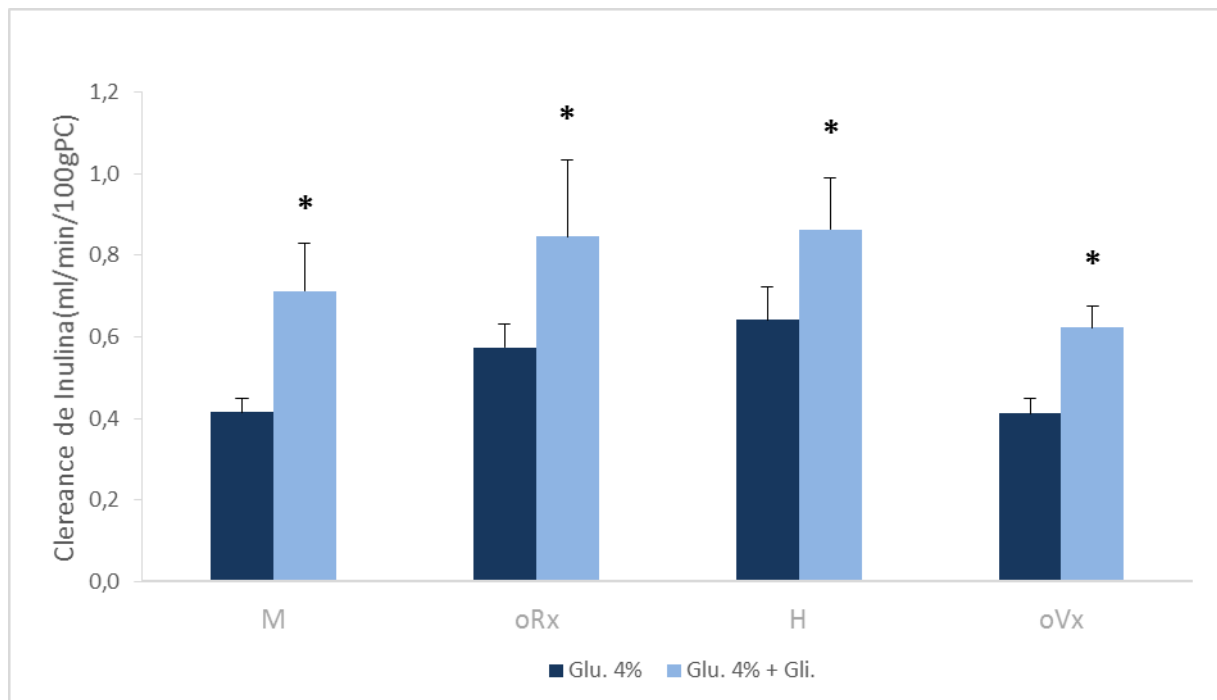


Figura 14: Clearance de inulina en los diferentes grupos. Se observa que todos los grupos tratados con glibenclamida presentan diferencias significativas respecto de su control Glu. 4% * $p < 0,05$.

El filtrado glomerular aumentó luego del tratamiento con glibenclamida en todos los grupos (Fig. 14), dentro de los valores de referencia (0,4 – 1,2 ml/min/100g PC). Los grupos control Glu. 4% presentan un FG de $0,51 \pm 0,06$, y los grupos tratados de $0,76 \pm 0,06$ ml/min/100gPC ($p < 0.01$).

4.2 Balance hidrosalino

El tratamiento con glibenclamida no modificó el volumen de excreción urinaria (77 ± 9 ml/día), respecto del grupo control (68 ± 9 ml/día). Solo en el grupo oVx, el volumen descendió por debajo de la media (45 ± 5 ml/día); variación que no estuvo asociado con la inhibición del canal de potasio. A su vez, no se observaron variaciones en la osmolaridad urinaria en ninguno de los grupos en estudio (331 ± 116 vs 227 ± 57 mOsm/KgH₂O).

4.2.1 Excreción y fracción excretada de potasio

Se observó una disminución de la excreción de potasio en los animales machos enteros y ovariectomizadas tratados con Gli. ($0,53 \pm 0,15$ y $0,77 \pm 0,17$ mEq/día/100g PC, respectivamente) respecto de a sus controles con Glu. 4% ($p < 0.05$ en ambos casos), no observándose cambios en los grupos de las hembras enteras y orquidectomizados (Fig. 15).

La fracción excretada de potasio presentó cambios similares a los observados a la excreción en machos enteros y ovariectomizadas tratados con Gli. ($10,00 \pm 2.44$ y 18.33 ± 3.59 / 100g PC respectivamente $p < 0.05$), respecto de sus controles.

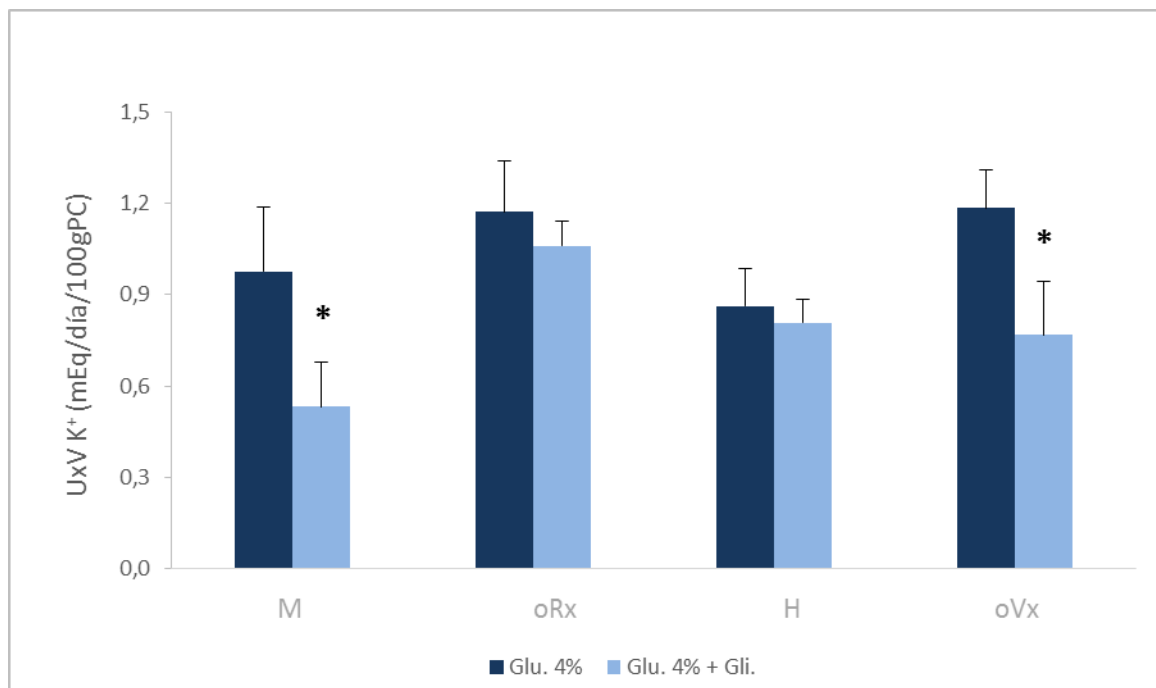


Figura 15: Excreción de potasio en los diferentes grupos en estudio. Se observa que los animales M y oVx presentan cambios significativos ante el tratamiento con Gli. respecto de su control Glu. 4%. * $p < 0,05$.

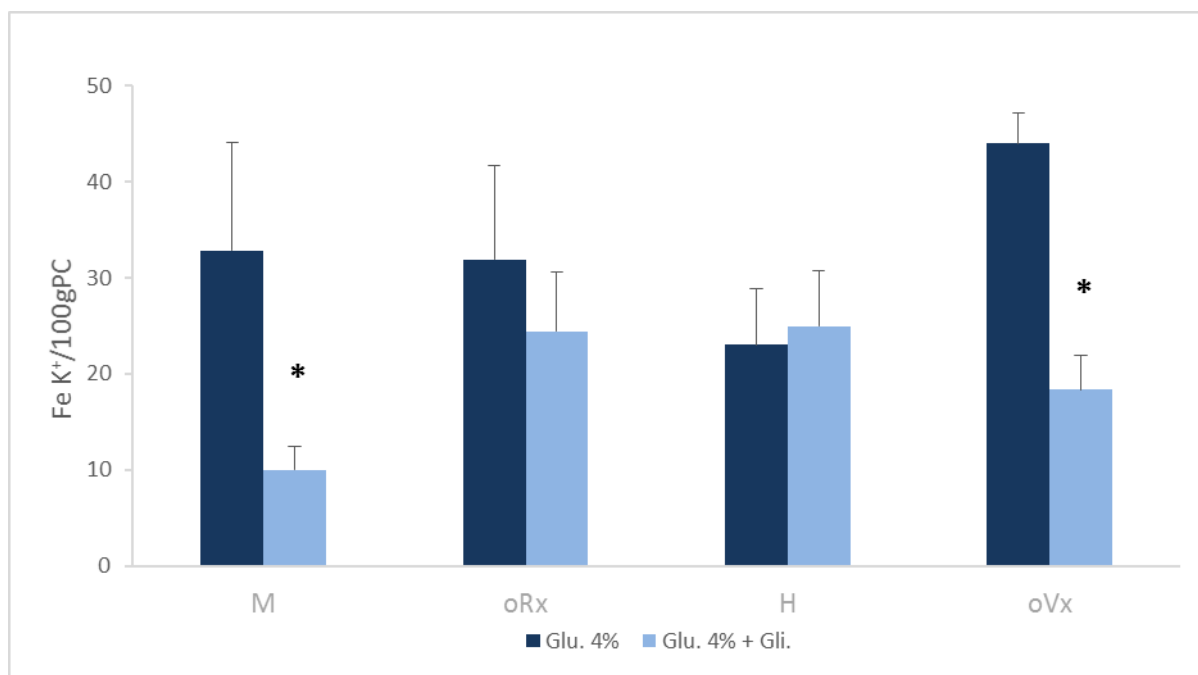


Figura16: Fracción excretada de potasio por 100 g PC. El tratamiento con Gli. disminuye en M y oVx. * $p < 0,05$.

4.2.2 Excreción y fracción excretada de sodio

En la excreción de sodio, observamos que el efecto de la glibenclamida generó un aumento en la excreción en las hembras enteras ($1,20 \pm 0,17$) respecto de su control Glu. 4% ($0,58 \pm 0,08$ mEq/día/100g PC, $p < 0,05$), mientras que en los demás grupos no

se observaron diferencias significativas (Fig.17). La fracción excretada de sodio, aunque mostró la misma tendencia que en la excreción observada en hembras enteras, no fue significativa.

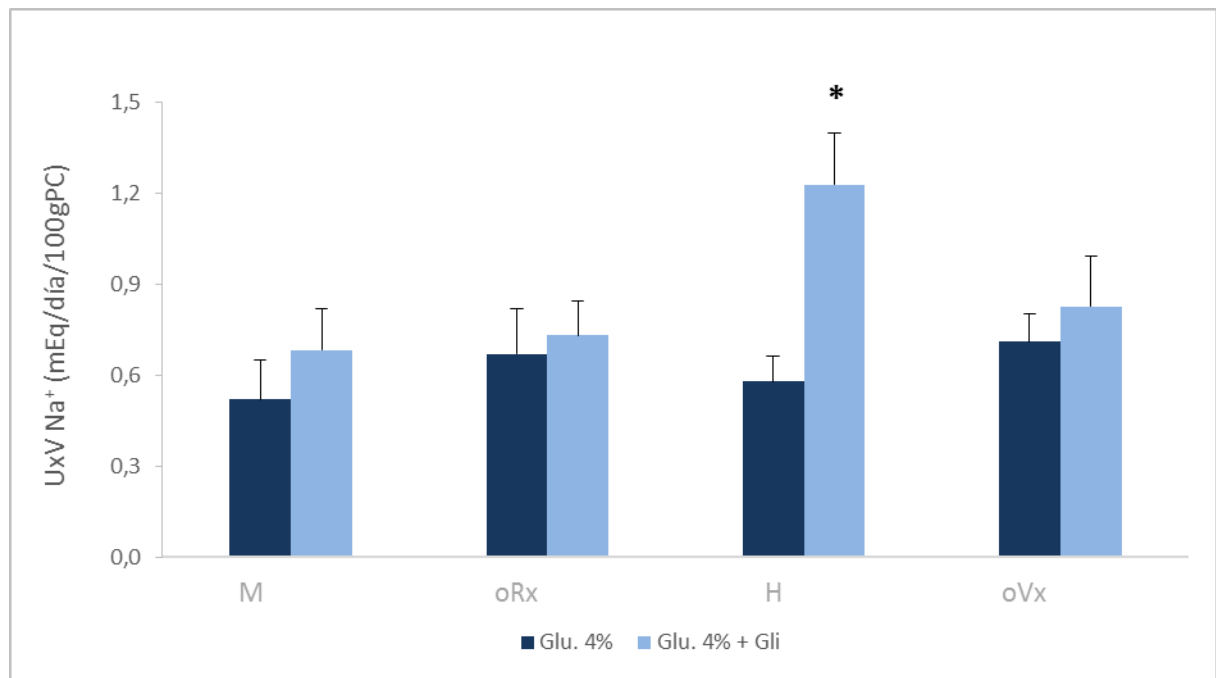


Figura 17: Excreción de sodio. H Glu. vs H Gli. * $p < 0,05$, sin deferencias en el resto de los grupos.

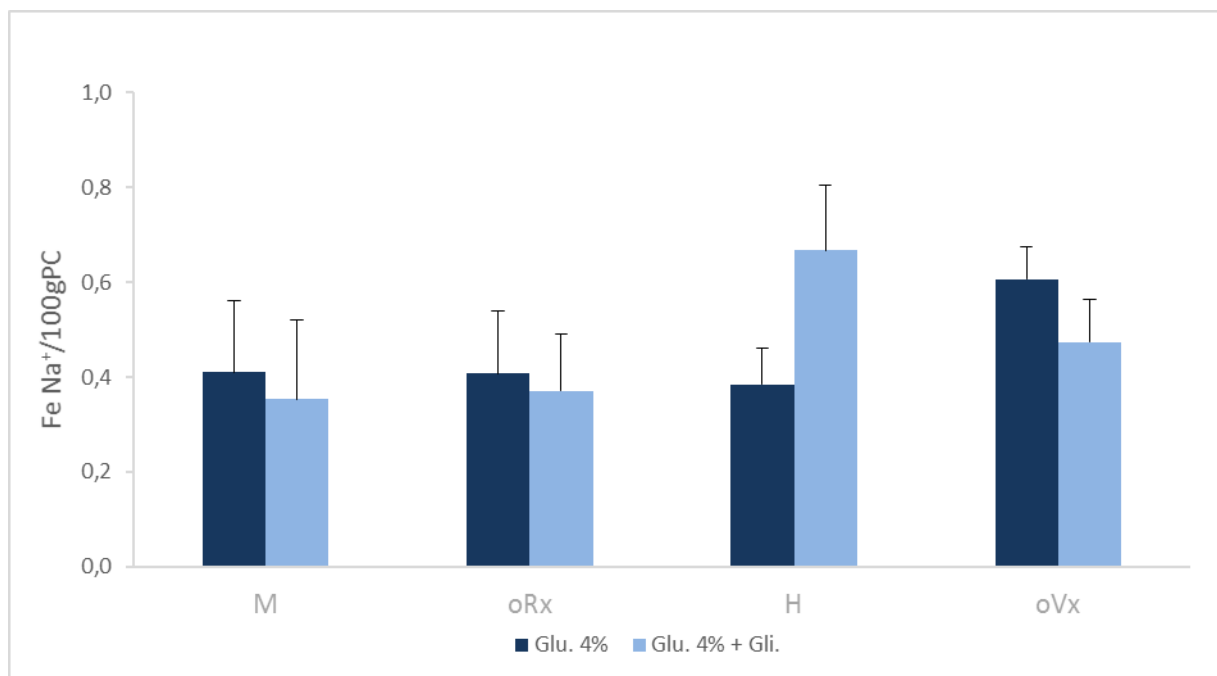


Figura 18: Fracción excretada de sodio por 100 g PC. Sin deferencias significativas.

4.2.3 Relación Na^+/K^+ urinaria

Para evaluar el efecto de la glibenclamida sobre el balance hidrosalino, se estudió la relación Na^+/K^+ , en donde se observó un aumento en M, H y oVx ($p < 0,05$) respecto de sus grupos controles Glu. 4% (Fig. 19).

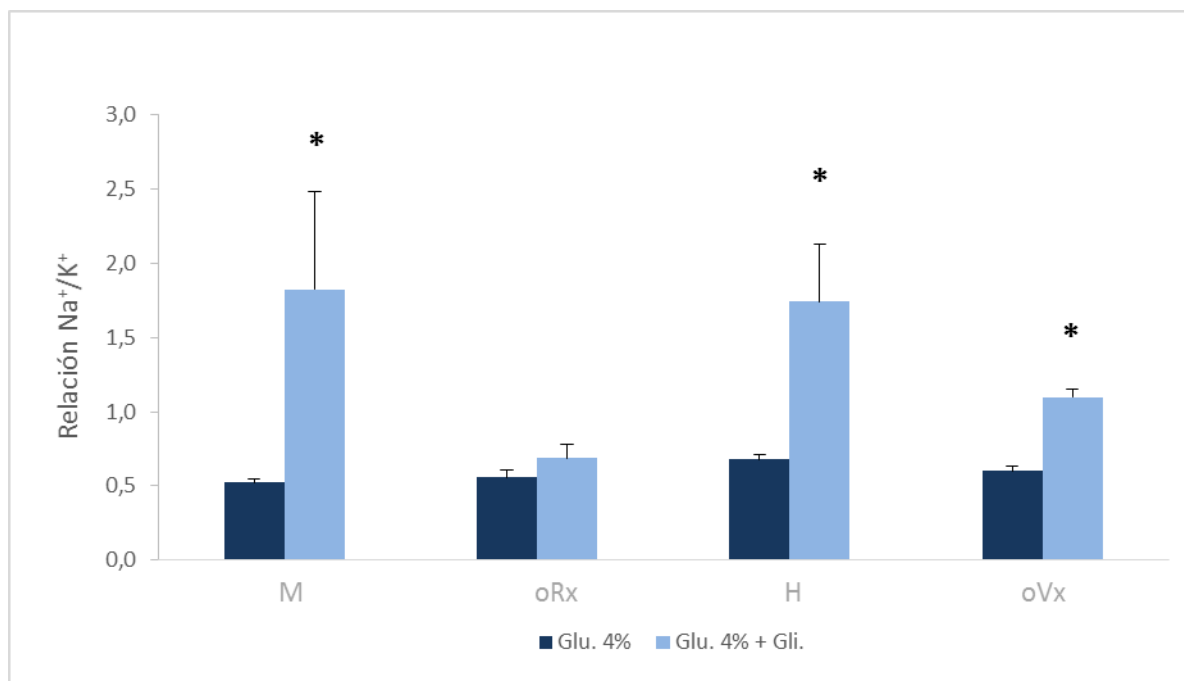


Figura 19: Relación Na^+/K^+ urinaria en los diferentes grupos. Se observa que, en M, H y oVx tratados con glibenclamida presentan diferencias significativas respecto de su control Glu. 4% * $p < 0,05$.

Además, la excreción urinaria de Na^+ y K^+ fueron directamente proporcionales ($r = 0,99$; $p < 0,05$), y luego del tratamiento con glibenclamida se mantuvo la relación ($r = 0,81$; $p < 0,05$) pero disminuyó la pendiente (Fig. 20) ($p < 0,001$). La excreción urinaria diaria de Na^+ presentó relación directamente proporcional a la de K^+ ($r = 0,94$; $p < 0,05$) y dicha relación que se pierde post tratamiento con Gli.

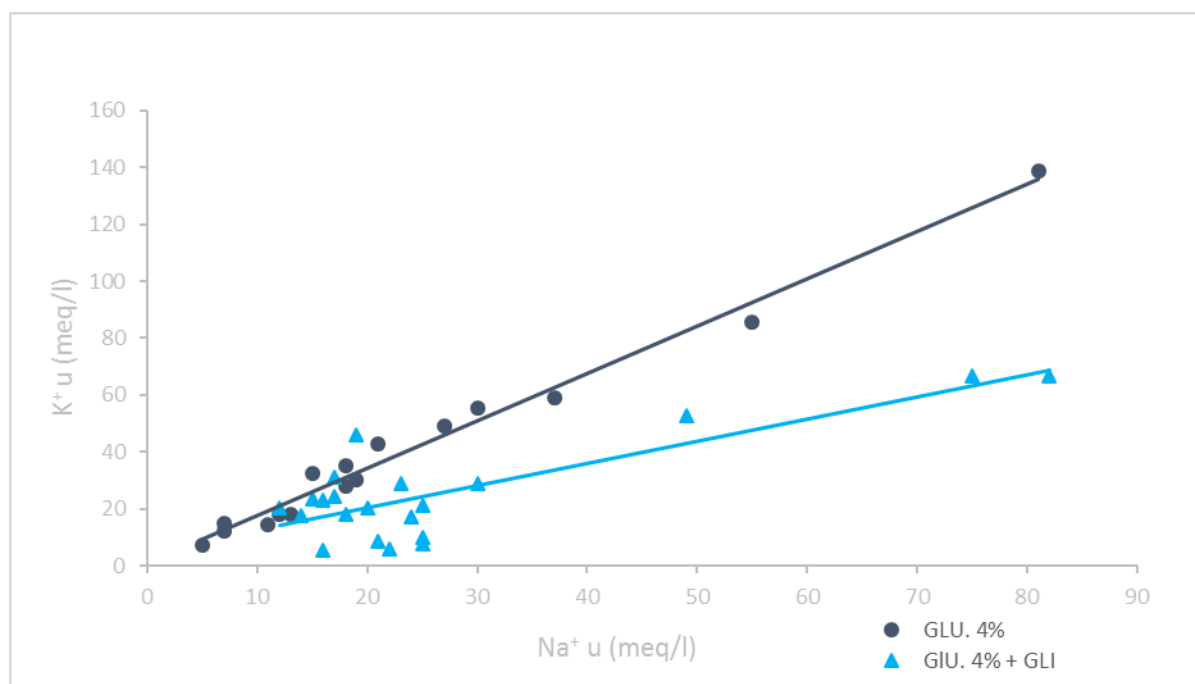


Figura 20: Excreción urinaria de Na⁺ y K⁺ de grupos control (Glu. 4%) vs tratados con Glu. 4% + Gli. Se observa que el tratamiento modifica la pendiente $p < 0,05$.

5. ALDOSTERONA

Los niveles de aldosterona plasmática no fueron modificados luego del tratamiento con glibenclamida (55 ± 12 vs 49 ± 10 pg/ml); no siendo diferentes en animales enteros (51 ± 13 vs 56 ± 15 pg/ml), ni gonadectomizados (64 ± 23 vs 40 ± 13 pg/ml).

Estos resultados demuestran que la glibenclamida varía la relación de excreción Na⁺/K⁺, efecto que es modulado según sexo y presencia de gónadas. En animales machos enteros disminuye la excreción de K⁺ y en las hembras aumenta la excreción de Na⁺; mientras que la remoción de gonadas cambia la relación entre iones, disminuyendo la excreción de K⁺ luego de la oVx, comportamiento semejante al de las ratas macho enteras. Estos cambios no estarían relacionados con cambios en la aldosterona.

6. ESTUDIO DE LOS TRANSCRIPTOS Kcnj1 y Atp1a1 EN MEDULA RENAL

En relación a los transcritos estudiados, los niveles de ARNm de Atp1a1 y Kcnj1 en médula renal fueron directamente proporcionales a la excreción urinaria osmolar diaria ($r=0,59$; $p < 0,02$ y $r=0,54$; $p < 0,03$ respectivamente) en los grupos Glu. 4% y solo

el transcripto Atp1a1 conservo dicha relación post tratamiento con Gli. ($r=0,66$; $p < 0,05$) con diferente pendiente ($p < 0,05$). Además, se observó que niveles de Kcnj1 en médula renal fueron inversamente proporcionales al filtrado glomerular ($r=0,53$; $p < 0,03$) sólo en el grupo Glu 4%.

6.1 Efecto de la glibenclamida sobre la expresión génica de Kcnj1 en médula renal

En la figura 21 se observa el efecto de la glibenclamida sobre los niveles de Kcnj1 en médula renal, presentando una marcada disminución en todos los grupos post tratamiento. Al evaluar los diferentes grupos experimentales, podemos observar que la mayor respuesta se evidenció en el grupo oVx.

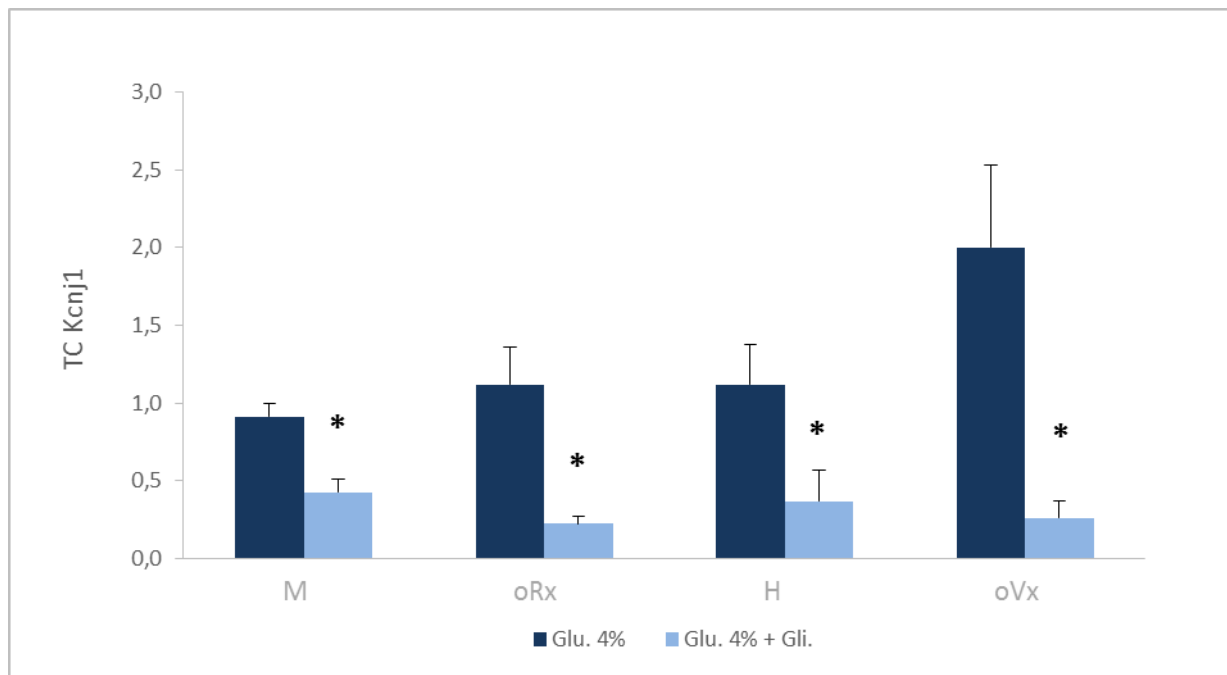


Figura 21: Efecto de la Gli. sobre los niveles de ARNm de Kcnj1 en médula renal. Glu. 4% vs Glu. 4% + Gli. * $p < 0,01$

6.2 Efecto de la glibenclamida sobre la expresión génica de Atp1a1 en médula renal

El tratamiento con glibenclamida, generó una disminución homogénea del transcripto Atp1a1 en todos los grupos respecto de los controles Glu. 4%, efecto similar al observado para el de Kcnj1, sin diferencias por sexo, o ausencia de gónadas (Fig.22).

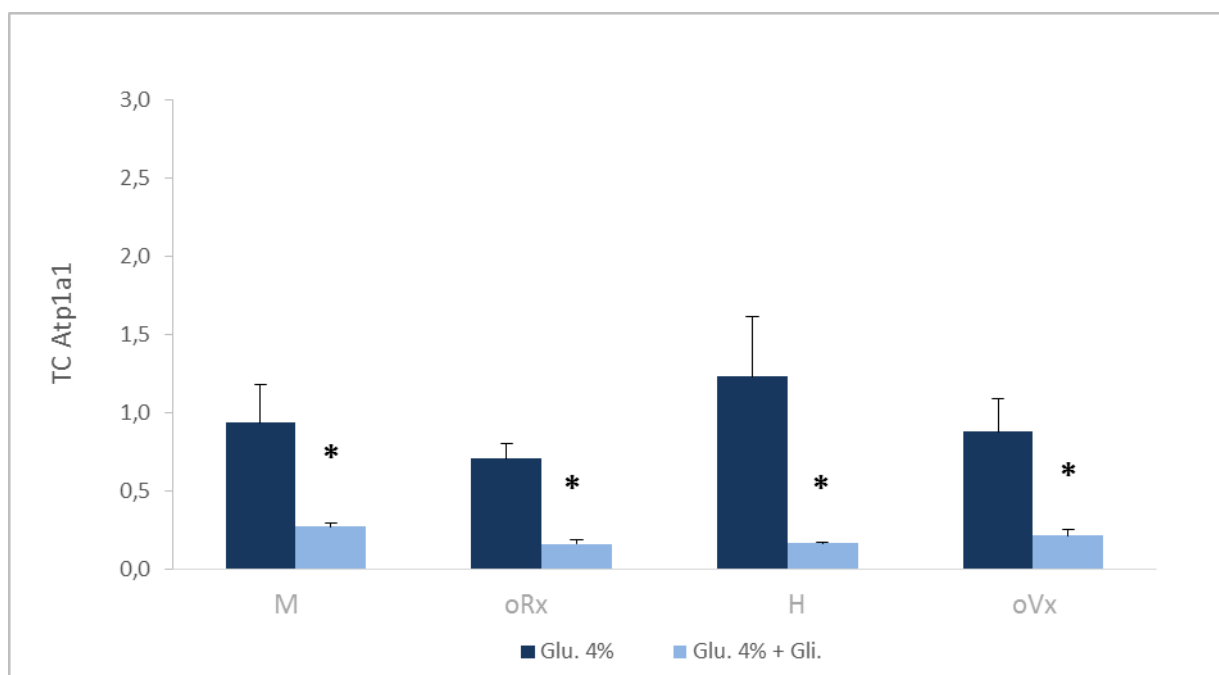


Figura 22: Efecto de la Gli. sobre los niveles de ARNm de Atp1a1 en médula renal. Glu. 4% vs Glu. 4% + Gli. * $p < 0.01$

7. ESTUDIO DE LOS TRANSCRIPTOS Kcnj1 y Atp1a1 EN CORTEZA RENAL

En corteza renal de los grupos Glu 4%, los niveles de Atp1a1 mostraron una asociación inversa a los de Kcnj1 ($r=0,56$; $p < 0,02$) y a la relación Na^+/K^+ urinaria ($r=0,56$; $p < 0,02$). También se observó que los niveles de Kcnj1 fueron directamente proporcionales a la relación Na^+/K^+ ($r=0,56$; $p < 0,03$), e inversamente proporcional a la excreción diaria de K^+ ($r=0,50$; $p < 0,02$).

7.1 Efecto de la glibenclamida en la expresión génica de Kcnj1 y Atp1a1

Los niveles de transcripto para Kcnj1 (tabla 1) y Atp1a1 (tabla 2) en corteza renal no mostraron cambios significativos entre los grupos estudiados, siendo menores en respecto a los obtenidos en médula.

	M	oRx.	H	oVx.
Glu. 4%	0,282 ± 0,062	0,083 ± 0,018	0,684 ± 0,160	0,264 ± 0,114
Glu. 4% + Gli.	0,105 ± 0,041	0,098 ± 0,031	0,504 ± 0,118	0,226 ± 0,102

Tabla 1: Promedio de la tasa de cambio del ARNm Kcnj1 en corteza.

	M	oRx.	H	oVx.
Glu. 4%	0,083 ± 0,011	0,296 ± 0,020	0,114 ± 0,019	0,155 ± 0,030
Glu. 4% + Gli.	0,125 ± 0,019	0,189 ± 0,025	0,086 ± 0,011	0,194 ± 0,062

Tabla 2: Promedio de la tasa de cambio del ARNm Atp1a1 en corteza.

8. EFECTO DE LA GONADECTOMIA EN LA EXPRESION GENICA DE Kcnj1 y Atp1a1

Para analizar la expresión génica de ambos transcritos entre animales enteros y gonadectomizados, se realizó una correlación lineal de los valores obtenidos en corteza y médula renal, mostrando que en esta última fue directamente proporcional, no así en corteza. La relación en médula mostró diferente pendiente entre animales intactos respecto de Gx. (Fig.23).

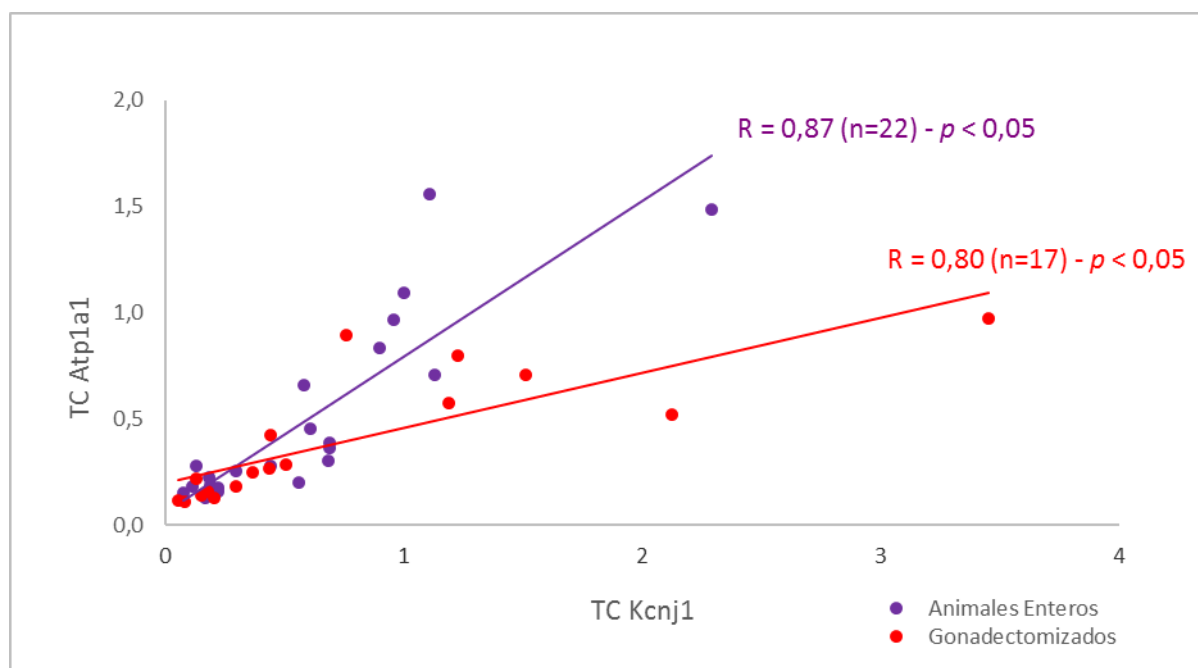


Figura 23: Relación de transcritos en médula renal. La Gx. modifica las pendientes respecto de los animales intactos ($p < 0,05$).

9. EFECTOS DEL TRATAMIENTO SOBRE EL SISTEMA KALIKREINA KININA

Los machos enteros presentan un aumento de Klk1 luego de la administración de glibenclamida (0.8 ± 0.34 a 2.3 ± 0.53 , $p < 0.05$) (Fig. 24).

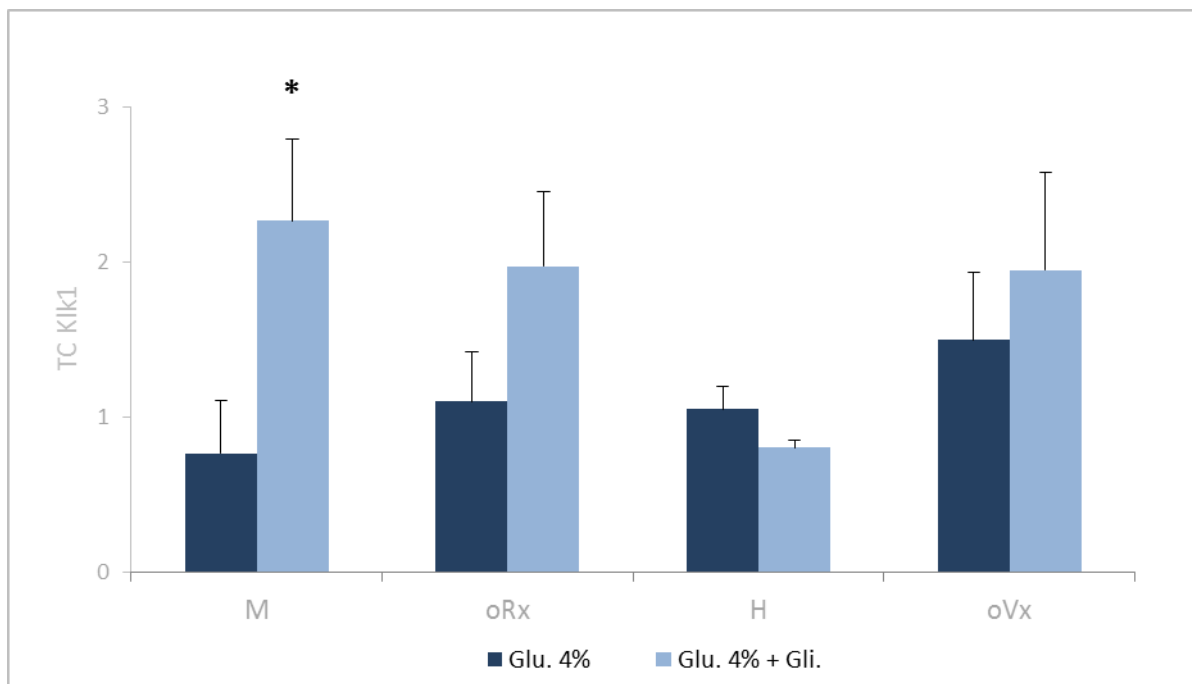


Figura 24: Tasa de cambio de Kik1 en corteza renal. M Glu. 4% vs M Glu. 4 % + Gli. * $p < 0,05$.

En la figura 25 se muestran los resultados sobre la excreción de Kalikreina Urinaria (KU) en los distintos grupos estudiados, en los que no se observan cambios post tratamiento con glibenclamida.

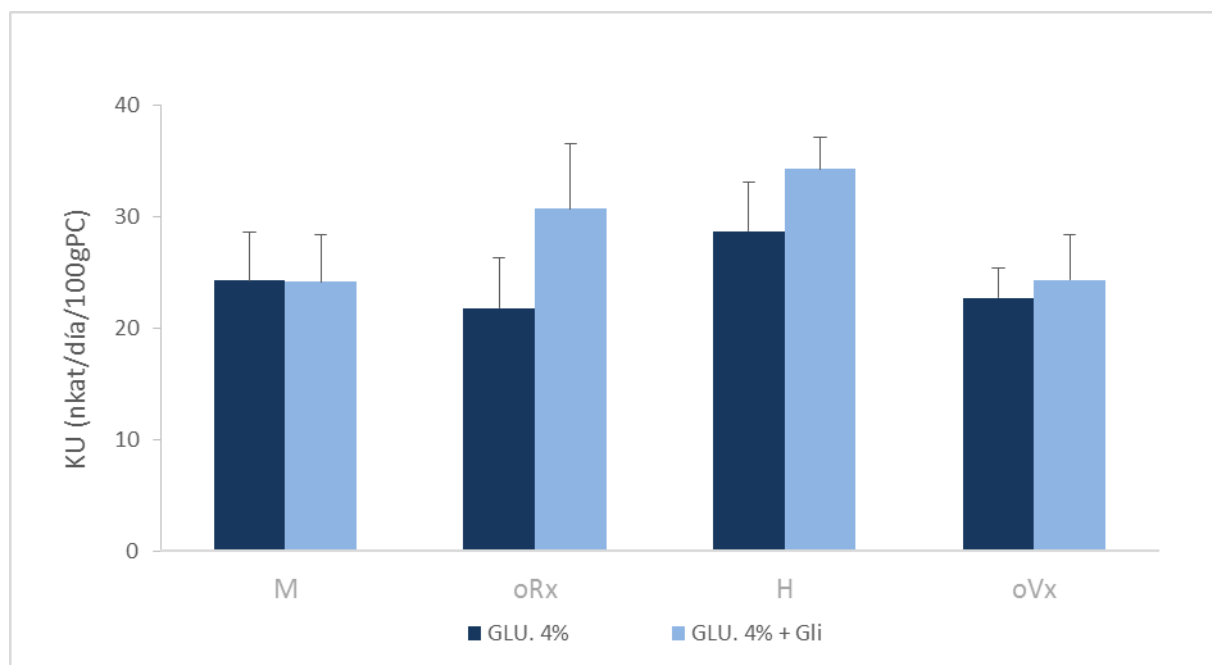


Figura 25: Actividad de kalikreina urinaria. No se observaron diferencias post tratamiento con glibenclamida.

10. ANALISIS MULTIVARIADO DE LA VARIANZA (MANOVA)

Se realizó un análisis multivariado de la varianza, utilizando las variables excreción de Na^+ y K^+ urinario, niveles de ARNm de *Klk1*, *Atp1a1* y *Kcjn1* en médula y corteza renal, relación Na^+/K^+ urinario, KU, osmolaridad urinaria y clearance de inulina. Se estudiaron tres factores fijos (tratamiento con glibenclamida, sexo y gonadectomía) y sus interrelaciones. El valor de traza de Pillai fue significativo para la intercepción (0.99, $p < 0.001$) y tratamiento con glibenclamida (0.89, $p < 0.001$).

Las pruebas de efecto intersujetos mostró relación significativa entre ARNm de *Atp1a1* y *Kcjn1* en médula renal y la relación Na^+/K^+ urinaria y tratamiento con glibenclamida ($r^2 = 0.79$ para los tres casos, $p < 0.0001$). Además, se encontró interacción entre el tratamiento con glibenclamida y la gonadectomía (0.49, $p < 0.022$). Estas relaciones modificaron significativamente el r^2 luego del ajuste por el modelo.

11. DISCUSION

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que el incremento en la ingesta de potasio activa al sistema kalikreína kinina y genera una disminución de la presión arterial, con un aumento concomitante de la aldosterona plasmática. (15) Estos resultados llevaron a estudiar diferentes situaciones experimentales inhibiendo el receptor de aldosterona, el canal epitelial de sodio y el rectificador de potasio de la médula externa renal.

En la presente tesis nos centramos en la inhibición del canal ROMK por glibenclamida, que aumenta la relación Na^+/K^+ urinaria, tal como lo describieran otros grupos por diferentes inhibidores. (28, 29, 30)

Nuestros hallazgos muestran datos nobles sobre esta cepa particularmente interesante que representa una patología altamente prevalente de capital importancia en salud humana. Además, incursionan sobre la posible influencia de la presencia de las gónadas como un aspecto a investigar, mostrando que la remoción de las mismas modifica la excreción de Na^+ y K^+ de forma diferencial. El análisis del balance hidrosalino evidencia una relación directamente proporcional entre la excreción de Na^+ y K^+ , y que el tratamiento con glibenclamida modifica su pendiente (Fig. 20), indicando la alteración del manejo tubular de solutos. Esta respuesta acoplada entre Na^+ y K^+ urinario podría ser explicada por la modificación del transporte de iones en el asa ascendente gruesa de Henle, ya que la inhibición del canal ROMK impide el reciclado de K^+ necesario para establecer el gradiente electroquímico en la reabsorción de NaCl a través del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ apical. (8,10) A esto se le agrega el bloqueo del canal ROMK en el túbulo contorneado distal, que genera un segundo sitio de acción para impedir la reabsorción de Na^+ por el mencionado mecanismo, ahora acoplado al ENaC . Así la orina se ve enriquecida en Na^+ y puede o no disminuir la concentración de K^+ , según el inhibidor utilizado. (31)

En nuestros experimentos encontramos una diferente respuesta según sexo y presencia de gónadas. En ratas macho y ovariectomizadas la relación Na^+/K^+ aumenta en asociación a un descenso en la excreción de K^+ , mientras que en las hembras enteras se asocia a un aumento en la excreción de Na^+ . (Fig. 15 y 17) Dicho fenómeno fue ratificado por las diferencias en la excreción fraccional de ambos iones, especialmente en la de K^+ . (Fig. 16 y 18) Esto sugiere que existe un efecto modulador hormonal y que dicha modulación se invierte si se remueven las gónadas femeninas. Según nuestro conocimiento, estos cambios no han sido comunicados anteriormente en ningún modelo experimental, por lo que se requerirían experimentos adicionales que diluciden los mecanismos implicados en tal regulación.

El filtrado glomerular aumentó en todos los grupos experimentales después de los cambios electrolíticos observados post tratamiento con glibenclamida, aunque con valores dentro del rango de referencia. Un estudio realizado en ratas Wistar y SHR preñadas, mostró que el clearance de creatinina aumenta al bloquear el canal ROMK con glibenclamida. Los autores no atribuyen los cambios en el clearance al tratamiento. (32) Nuestros datos, en cambio, muestran una consistente relación entre el filtrado glomerular medido por inulina y la inhibición del canal (Fig. 14). Esto podría atribuirse a diferencias en la carga de iones a nivel del aparato yuxtaglomerular y al bloqueo del canal ROMK en las células de la macula densa que impediría el correcto censado de NaCl necesario para adecuar la presión de filtración glomerular y mantener el balance glomérulo-tubular. (33, 34)

En el modelo estudiado, los cambios en la excreción de solutos y filtrado glomerular no fueron acompañados por cambios en la presión arterial. En estudios previos demostramos que la gonadectomía disminuía la presión arterial, aumentando los niveles de aldosterona plasmáticos, y que un antagonista de su receptor (espironolactona) generaba un aumento de la presión arterial. (35) A su vez, tras la

gonadectomía estos animales presentaban un aumento de kalikreina urinaria que era abolido por la administración de espironolactona. Dicha situación sugiere que la aldosterona podría jugar un papel importante en la regulación del sistema kalikreina kinina, y que dicha acción podría estar mediada por los canales que ella misma regula para el transporte de iones. Experimentos en la inhibición del ENaC por benzamil mostraron que la presión arterial disminuía en todos los grupos estudiados, inclusive los gonadectomizados, con aumento de los niveles aldosterona plasmático y sin modificar los niveles de kalikreina urinaria. (36) En este trabajo mostramos que la inhibición del canal ROMK no modifica los niveles de presión arterial, de aldosterona ni de kalikreina urinaria. Estos resultados sugieren que existe una relación entre aldosterona y kalikreina urinaria, y que la inhibición de los canales ENaC y ROMK no la modifican. Sin embargo, los depósitos tisulares de kalikreina aumentan por la aldosterona, efecto que se revierte con el bloqueo de su receptor (35), y aumentan con el tratamiento de benzamil, especialmente en los animales gonadectomizados. (36) Esto sugiere que la aldosterona y el ENaC juegan un rol en la liberación de kalikreina a la orina, y que dicho canal interviene en la acción de la hormona en el mencionado proceso. No se disponen de datos sobre los niveles de kalikreina renal en la inhibición por glibenclamida, por lo cual no podemos evaluar su efecto sobre la liberación de la misma.

Los niveles de ARNm de Kik1 en corteza renal no mostraron cambios post tratamiento con glibenclamida, excepto en los machos enteros; resultados similares a los encontrados con benzamil. (36) A su vez, experimentos previos mostraron que el ARNm de dicho gen aumentaba con el incremento de los niveles de aldosterona, y que disminuía post tratamiento con espironolactona (35), sugiriendo que el receptor a aldosterona estaría involucrado en la regulación transcripcional de dicho gen, sin participación de los canales estudiados.

En vista de la diferente modulación en la excreción de Na^+ y K^+ según sexo y gonadectomía, el análisis de los transcritos de *Kcnj1* y *Atp1a* fue un aspecto importante a estudiar. Los resultados muestran que *Kcnj1* disminuye sus niveles tras la inhibición de su producto proteico en médula renal (Fig. 21). Esto podría deberse a la abundancia proteica, y a la mayor actividad de los transportadores de K^+ (ROMK) en médula renal, con lo cual su inhibición se hace más evidente. Una posible explicación al fenómeno descrito sería la existencia de un control negativo y reprimible de la transcripción, donde el producto final de la ruta biosintética es quien regula la síntesis de su ARNm. En este estudio, el bloqueo podría ser interpretado como un exceso en la cantidad de proteína disponible y que esto genera un *feedback* negativo de la transcripción o un aumento de la degradación del ARNm. No se realizaron estudios de cuantificación proteica, ni de actividad que validen o descarten esta elucubración.

Estos cambios observados en *Kcnj1* se vieron acompañados de una caída en los niveles de ARNm de *Atp1a1*. La regulación acoplada de la síntesis de ambos transcritos ya había sido mencionada en un estudio previo sobre el efecto de la adrenalectomía y modulación de la dieta de potasio, en el cual los cambios en *Atp1a1* se correlacionaban directamente con los de *Kcnj1*, y que dichos niveles en médula renal se correlacionaban con la concentración plasmática de K^+ . (37) Nuestros resultados obtenidos del bloqueo de ROMK coincidirían con que el transporte de K^+ , al menos en parte, se encuentra implicado en su regulación génica. Estos datos refuerzan la hipótesis de cómo el transporte de K^+ afecta directamente la expresión génica de *Kcnj1* y *Atp1a* en paralelo. Los canales ROMK median la salida de K^+ desde el compartimiento intracelular, y están condicionados principalmente por la bomba ATPasa Na^+/K^+ , por lo que variaciones en la concentración de la aldosterona y la modulación del transporte de K^+ , tienen un efecto directo sobre la expresión génica de ATPasa Na^+/K^+ . Es de notar que en el trabajo citado hubo una marcada respuesta cortical asociada a una disminución de aldosterona post

adrenalectomía. (37) En el presente estudio no hubo diferencias en los niveles corticales de ambos transcritos en presencia de una aldosteronemia normal, lo que sugiere que dicha hormona estaría regulando la transcripción a través de su receptor.

El análisis de resultados post tratamiento con glibenclamida, muestran que la gonadectomía altera la expresión de estos genes y que la presencia de los órganos sexuales durante la administración del fármaco fue capaz de modificar la respuesta (Fig. 22). Así, puede sugerirse que las hormonas sexuales, sus receptores ó su vía de señalización están implicados en los mecanismos de respuesta. Es conocida la actividad a nivel de la transcripción genómica de los receptores estrogénicos y androgénicos que, en simultáneo, modulan la activación ó represión de sus genes blancos. (38, 39)

En resumen, la inhibición del ROMK fue modulada por la presencia de gónadas e indujo cambios drásticos en la expresión génica de *Kcjn1* y *Atp1a1* en médula renal, alterando la excreción urinaria de iones sin mostrar variaciones en la presión arterial o aldosterona.

El conjunto de los resultados obtenidos en los diferentes abordajes sobre la regulación del sistema kalikreina kinina, nos indican la existencia de un rol modulador de la aldosterona y su receptor, teniendo una contribución mínima o ausente los canales ENaC y ROMK en dicho mecanismo. Destacamos la necesidad de nuevos experimentos para dilucidar el mecanismo preciso por el cual se regula el sistema kalikreina kinina renal por aldosterona y hormonas sexuales.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*, 104(4), 545-556
2. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology, 10th Ed Elsevier Science, Unidad 5: Líquidos corporales y los riñones. Pag. 285 – 409.
3. Goligorsky MS, Lijima K, Krivenko Y, Tsukahara H, Hu Y, Moore LC (1997). Role of mesangial cells in macula densa to afferent arteriole information transfer. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 24(7), 527-531
4. Boron W, Boulpaep EL. (2009) Medical Physiology : A cellular and molecular approach Philadelphia, PA : 2nd Ed Saunders/Elsevier Science. Chapter 34: Glomerular filtration and renal blood flow.
5. Jorgensen PL, Håkansson KO, and Karlsh SJD (2003). Structure and mechanism of Na, K-ATPase: Functional sites and their interactions *Rev. Physiology*. 65:817– 49
6. Palmer LG, Choe H, Frindt G (1997). Is the secretory K channel in the rat CCT ROMK? *American Journal Physiology*, 273 (3), F404 - 410.
7. Carsten A. Wagner New roles for renal potassium channels Makoto Katori and Masataka Majima (2009). Recent developments in the regulation of kinins. ATP-sensitive potassium channel blockers hypertension *Research* 32, 220–226
8. Hamilton KL, Devor DC (2012). Basolateral membrane K⁺ channels in renal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 302(9), F1069-F1081
9. Wagner CA, Loffing-Cueni D, Yan Q, *et al.* (2008). Mouse model of type II Bartter's syndrome. II. Altered expression of renal sodium- and water-transporting proteins. *American Journal Physiology - Renal Physiology*, 294(6), F1373 - F1380.
10. Hebert SC (1998). Roles of Na-K-2Cl and Na-Cl cotransporters and ROMK potassium channels in urinary concentrating mechanism. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 275(3), F325-F327
11. Beraldo WT (1952). Substance U—a Depressor and smooth-muscle stimulating principle present in urine. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 171(2), 371-377
12. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A (2005). The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *Journal of Pharmacological Sciences*, 99(1), 6-38

13. Granger JP, Hall JE (1985). Acute and chronic actions of bradykinin on renal function and arterial pressure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 248(1), F87-F92
14. Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Brett SE, Bender N, Ritter JM (1994). Inhibition of bradykinin-induced vasodilation in human forearm vasculature by icatibant, a potent B2-receptor antagonist. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 38(4), 317-321
15. Oddo EM, De Luca Sarobe V, Krmar R, Martín RS, Ibarra FR, Arrizurieta EE (2008). Urinary kallikrein and blood pressure—Gender-Different response to potassium supplementation in SHR. *Nephron Physiology*, 108(3), p37-p45
16. Jin L, Chao L, & Chao J (1999). Potassium supplement upregulates the expression of renal kallikrein and bradykinin B2 receptor in SHR. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 276(3), F476-F484
17. Azurmendi PJ, Oddo EM, Obika LF, *et al.* (2009). Gonadectomy influence blood pressure through kallikrein kinin system. *Kidney Blood Press Research*. 32(5): 342-8.
18. Corbera NL, Azurmendi PJ, Toro A, Martín RS, Ibarra FR, Oddo EM, Arrizurieta EE (2009). Regulación del sistema kalikreina kinina (SKK) por Aldosterona en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. *Revista Medicina (Bs. As.)* 69 (supl. I):198
19. Okamoto K, Aoki K (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal* 27:282-93.
20. Rivera CC, Hernández RG, Marin HS (2013). Reproductive management of colonies to spontaneously hypertensive rat (SHR) and normotensive Wistar Kyoto (WKY) in the Institute of Cellular Physiology, National Autonomous University of Mexico. *REDVET Rev. Elec. vet.* Vol. 14 N° 11B - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n11113B.html>
21. Pompermayer K, Souza DG, Lara GG, *et al.* (2005). The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney International*. 67(5):1785-96
22. Smith HW. (1951). *The kidney: structure and function in health and disease*. Oxford University Press, USA
23. Young MK, Raisz LG (1952). An anthrone procedure for determination of inulin in biological fluids. *Experimental Biology and Medicine*, 80(4), 771-774
24. Technical Manual of SV Total RNA Isolation System. Promega.
25. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 1026-1030.

26. Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45-e45
27. Amundsen E, Putter J, Friberger P, Knos M, Larsbraten M, Claeson G (1979). Methods for the determination of glandular kallikrein by means of a chromogenic tripeptide substrate. In *Kinins—II* (pp. 83-95). Springer US.
28. Konstas AA, Dabrowski M, Korbmacher C, Tucker SJ. (2002). Intrinsic sensitivity of Kir1. 1 (ROMK) to glibenclamide in the absence of SUR2B Implications for the identity of the renal ATP-regulated secretory K⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21346-21351.
29. McNicholas CM, Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G, Egan ME. (1996). Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 8083-8088.
30. Peskar BM, Ehrlich K, Peskar BA. (2002). Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), 969-974.
31. Wang T, Wang WH, Klein-Robbenhaar G, Giebisch G (1995). Effects of a novel KATP channel blocker on renal tubule function and K channel activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273(3), 1382-1389
32. Lima R, Tardim JCBM, Barros ME, Boim MA (2006). Role of Atp-sensitive potassium channels in normal and hypertension-associated pregnancy in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(9), 780-786
33. Schnermann J (2003). The juxtaglomerular apparatus: from anatomical peculiarity to physiological relevance. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(6), 1681-1694.
34. Brenner BM (2008). The renal circulation and glomerular ultrafiltration. Gong R, Dworkin LD, Brenner BM and Maddox DA *THE KIDNEY* 8th edition Vol. 1 Chapter 3 (91-129) Ed. SAUNDERS
35. Corbera NL, Azurmendi PJ, Toro AR, *et al* (2012). KALLIKREIN KININ SYSTEM (KKS) MODULATION BY MINERALOCORTICOID. Libro del Simposio. Vasoactive and Inflammatory Mediators - Pathophysiology and treatment of metabolic, ischemic and proliferative disorders, PARIS, FRANCIA, INSERM
36. Rayen Toro A (2010). Inhibición de la acción de la aldosterona mediada por el ENaC y el Sistema Kalikreina – kinina. (Tesis de licenciatura). Universidad de Buenos Aires - FCEN

37. Wald H, Garty H, Palmer LG, & Popovtzer MM (1998). Differential regulation of ROMK expression in kidney cortex and medulla by aldosterone and potassium. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 275(2), F239-F245
38. Wu RC, Smith CL, & O'Malley BW (2005). Transcriptional regulation by steroid receptor coactivator phosphorylation. *Endocrine Reviews*, 26(3), 393-399.
39. Beato M, Herrlich P, & Schütz G (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, 83(6), 851-857.

12. ANEXO

Tabla de *primers* y tamaño de los productos amplificados de los ARNm estudiados.

ARNm	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	TAMAÑO
Kcnj1	TTTGGGGCTACCGTTTCGTT	ACAGTGAGGGGTCTCCACTT	107 pb
Klk1	CTGCTCCTGCATGCCTGTTAC	GTGCAGCATCATTCCGTCCC	77 pb
B - ACTINA	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	AGGCCCTCTGAACCCTA	70 pb
ATP1a1	GGTGCAGCCCTTAGGATGTA	GATGAGAAGGGAGTAGGGGAAG	72 pb